



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2014

Pedro Manuel de Barros **Determinação de ometoato e acrilamida em**
Teixeira de Carvalho **águas de consumo humano**



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2014

**Pedro Manuel de Barros
Teixeira de Carvalho**

**Determinação de ometoato e acrilamida em
águas de consumo humano**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química, ramo de Química Analítica e Qualidade, realizado sob a orientação científica do Doutor Armando Silvestre, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e coorientação do Doutor João Pereira, diretor geral do laboratório de análise ambiental CESAB - Centro de Serviços do Ambiente.

Dedico este trabalho aos meus pais, por todo o apoio.

o júri

Presidente

Prof. Dr. Artur Manuel Soares da Silva
professor catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Mestre Sónia Maria Lemos Heleno Tarelho
especialista responsável do Serviço de Toxicologia Forense da
Delegação do Norte do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências
Forenses

Prof. Dr. Armando Jorge Domingues Silvestre
professor associado com agregação do Departamento de Química da
Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Neste último ano foram-me apresentados novos desafios e oportunidades, para que com desenvoltura, engenho e trabalho pudesse ultrapassar os obstáculos e enriquecer o meu conhecimento e experiência, tornando-me mais apto para atingir objetivos e adaptar a uma nova realidade profissional.

Desejo aqui agradecer ao doutor João Pereira por me receber no Cesab – Centro de Serviços do Ambiente e pelo tema proposto para a realização da tese, dispondo dos meios e de atenção para o progresso e desenvolvimento do trabalho experimental numa área analítica transversal a laboratórios e indústria, de uma perspetiva profissional externa à realidade académica. À analista da cromatografia e mentora Sandra Pinheiro pela frutífera orientação e discussão relativas ao desempenho da técnica e tratamento de resultados, paciente e disponível.

Agradeço ao professor Armando Silvestre pelo estímulo, conhecimento, rigor e amizade sempre transmitidos ao longo do estágio.

O meu obrigado à minha família por todo o apoio e confiança depositados, à Márcia por incansavelmente me escutar e pelas palavras de incentivo, companhia e carinho, e aos meus amigos pelos momentos de distração e boa disposição, que equilibraram e alimentaram a determinação e empenho para atingir com sucesso as metas propostas.

A um futuro!

Palavras-chave

determinação, pesticidas organofosforados, ometoato, acrilamida, água, LC, MS/MS, SPE.

Resumo

As atividades de controle e promoção dos parâmetros de qualidade da água requerem como instrumento a disponibilidade de metodologias fiáveis e válidas, através do desempenho de técnicas analíticas que idealmente se apresentam seletivas, sensíveis, robustas e expeditas, enquadradas no âmbito de atividade de um laboratório de análise ambiental.

A inclusão do método para a determinação de ometoato no procedimento multi-pesticida praticado em rotina no laboratório de cromatografia constituiu a premissa para a escolha das condições de cromatografia líquida e especificações gerais de espectrometria de massa. O desenvolvimento e implementação de um método quantitativo para a análise de acrilamida advém da imposição legal de controle sobre os níveis presentes em água de consumo humano.

A otimização das condições de aquisição em MS/MS e os parâmetros avaliados para a identificação da entidade química permitem a deteção seletiva dos determinandos, ao avaliar o tempo de retenção característico e serem monitorizadas duas fragmentações específicas, mensuráveis e com um valor padrão da razão de intensidades.

A validação dos métodos compreendeu os procedimentos descritos no guia de validação do laboratório, ao protocolar a aplicação de testes estatísticos e o estudo dos parâmetros da regressão linear, complementados pela realização de ensaios independentes dos padrões preparados e amostras reais de matriz fortificada. As curvas de calibração foram construídas para concentrações enquadradas com os valores paramétricos, e o limite de quantificação instrumental estabelecido ao nível do primeiro padrão de calibração.

Os estudos em condições de repetibilidade permitiram a avaliação dos parâmetros de precisão e veracidade de medida, tendo procedido ainda à avaliação da homogeneidade de variâncias entre os dois níveis especificados.

Os valores experimentais produzidos em rotina foram utilizados para construir cartas de controlo, as quais constituem uma importante ferramenta para monitorizar o desempenho do método e avaliar tendências, determinando a aceitação do controlo de qualidade e a validação dos resultados. A combinação das componentes de precisão e exatidão determinadas em condições de precisão intermédia foram utilizadas para estimar a incerteza dos resultados experimentais.

O recurso à extração em fase sólida e a concentração do determinando assumem importância fundamental para que sejam atingidos limiares analíticos que permitam a quantificação de níveis vestigiais dos compostos pela técnica analítica de LC-MS/MS, dentro dos valores paramétricos impostos pela Diretiva Europeia de Qualidade da Água, transposta para a legislação nacional pelo DL nº 306/2007 de 27 de Agosto.

Keywords

determination, organophosphorous pesticides, omethoate, acrylamide, water, LC, MS/MS, SPE.

Abstract

The activities of control and promotion of water quality parameters require as instrument the availability of analytical methodologies which produce reliable and valid results, through the performance of techniques that ideally are selective, sensible, robust and expedite, when considered in the realm of an environmental analysis laboratory activity.

The implementation of the method for determination of omethoate in the multi-pesticide procedure practiced in the analytical routine constitutes the ground for the specification of liquid chromatography and mass spectrometry conditions. The development of a quantitative method for analysis of acrylamide is promoted by the legal imposition to control the residual levels of the compound in water for human consumption.

The optimization of MS/MS monitoring conditions and the parameters evaluated in the identification of the chemical entity allow the selective detection of the target compound, by considering the characteristic retention time and monitoring specific mass transitions, measurable and exhibiting a typical value for the calculated intensity ratio.

Method validation comprehended the procedures described in the laboratory validation guide, directing the application of statistical tests and the study of the linear regression parameters, complemented by the analysis of independent replicates of the prepared standard solutions and fortified samples. The calibration curve was built in a range of concentrations in the order of $\mu\text{g/L}$, with the quantification limit being established at the level of the first calibration standard.

The investigation work in conditions of repeatability allowed the evaluation of the precision and trueness measurement parameters, proceeding thoroughly to the evaluation of variances homogeneity between the two specified levels.

The experimental results produced in the routine execution of the technique were used to construct control charts, which provide an important tool for monitoring the method performance, acceptance of the internal quality control standards and validation of sample results,

The combination of precision and accuracy components determined in intermediate precision conditions were used for estimating uncertainty for both methods of analysis.

Sample processing by solid phase extraction and pre-concentration of the analyte acquire fundamental importance to attain the analytical thresholds which allow the quantification of vestigial levels of pesticide and acrylamide by the LC-MS/MS technique, within the parametric values imposed by the European Directive for Water Quality, transposed to the Portuguese law by the DL number 306/2007 of 27th of August.

Índice

Índice	i
Lista de Siglas.....	iv
1 Introdução.....	1
2 Compostos a estudar nesta tese	3
2.1 Pesticidas.....	3
2.1.1 Definição e contextualização do seu uso	3
2.1.2 Compostos organofosforados	6
2.2 Acrilamida.....	17
2.2.1 Origem no ambiente e enquadramento legal	17
2.2.2 Caracterização físico-química	19
3 Preparação de amostras	21
3.1 Amostragem e conservação das amostras.....	21
3.1.1 Compostos organofosforados	21
3.1.2 Acrilamida	22
3.2 Métodos de extração e pré-concentração de amostras.....	22
3.2.1 Compostos organofosforados	22
3.2.2 Acrilamida	29
4 Fundamentos analíticos abordados.....	33
4.1 Pesticidas.....	33
4.2 Acrilamida.....	34
5 Objetivos do trabalho experimental	37
6 Método analítico.....	38
6.1 Cromatografia líquida e espectrometria de massa	38
6.2 Análise de Brancos e interferentes.....	42
6.3 Monitorização de reação múltipla.....	44

6.3.1	Pesticida ometoato	44
6.3.2	Acrilamida	45
7	Validação de ensaios	46
7.1	Seletividade.....	46
7.2	Gama de trabalho	47
7.3	Linearidade	47
7.3.1	Teste de <i>Mandel</i>	47
7.3.2	Coeficiente de determinação (R^2).....	48
7.3.3	Teste de <i>Rikilt</i>	48
7.3.4	Análise de resíduos	49
7.3.5	Sensibilidade.....	49
7.4	Limites analíticos	50
7.5	<i>Carry-over</i> ou arrastamento.....	51
7.6	Exatidão	52
7.6.1	Precisão.....	52
7.6.2	Veracidade ou Justeza de medida.....	53
7.7	Incerteza do método.....	55
7.8	Robustez.....	55
8	Enquadramento de ensaios para a acreditação de laboratórios químicos.....	57
9	Material e métodos	58
9.1	Equipamento e material:	58
9.2	Reagentes e soluções.....	59
9.2.1	Reagentes.....	59
9.2.2	Soluções.....	60
9.3	Gases	61
9.4	Procedimento de extração em fase sólida	62
9.4.1	Pesticidas	62

9.4.2	Acrilamida	63
9.5	Método cromatográfico.....	67
9.5.1	Pesticidas	67
9.5.2	Acrilamida	68
9.6	Espectrometria de massa.....	69
9.6.1	Especificação dos parâmetros de operação do espectrómetro de massa ..	69
9.6.2	Otimização das condições de MS/MS	70
10	Discussão dos resultados	79
10.1	Validação do método de ensaio	79
10.1.1	Seletividade e identificação da entidade química.....	80
10.1.2	Calibração da resposta.....	82
10.1.3	Linearidade e parâmetros da regressão linear.....	84
10.1.4	Repetibilidade.....	88
10.1.5	Modelo de calibração e homocedasticidade	91
10.1.6	Ensaio de Recuperação	93
10.2	Análise Quantitativa em Rotina	97
10.2.1	Validação da calibração por fator de resposta	98
10.2.2	Padrões de controlo e ensaio de recuperação	99
10.2.3	Expressões de cálculo da concentração	99
10.2.4	Cartas de Controlo de Indivíduos	100
10.3	Exatidão	105
10.3.1	Precisão do método analítico	105
10.3.2	Veracidade ou justeza de medida	108
10.3.3	Estimativa da incerteza da determinação.....	109
11	Conclusões:.....	115
12	Referências	117

Lista de Siglas

ERSAR – Entidade Reguladora dos Serviços de Água e Resíduos

FAO – Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação

EPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América

OMS – Organização Mundial de Saúde

EU – União Europeia

DGAV – Direção Geral de Agricultura e Veterinária

IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*

ACE – Acetilcolinesterase

DL₅₀ – Dose Letal 50%

CL₅₀ – Concentração Letal 50%

ADI – Ingestão Diária Aceitável

NOEL – *Non Observed Effect Level*

ADME – Absorção, Distribuição, Metabolismo e Eliminação

BHE – Barreira Hemato-Encefálica

K_{ow} – Coeficiente de partição octanol-água

UDPGA – Ácido uridinodifosfatoglucurónico

DT₅₀ – Degradação total 50%

AA – Acrilamida

SPE – Extração em Fase Sólida

SPME – Micro-Extração em Fase Sólida

LLE – Extração Líquido-Líquido

QuEChERS – *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*

HLB – Balanço Hidrofílico-Lipofílico

LC – Cromatografia Líquida

Tr – Tempo de retenção

LBR – Branco de Reagente

MS/MS – Espectrometria de Massa Tandem

ESI – Ionização por *Electrospray*

Rf – Radiofrequência

m/z – Razão massa / carga

TQ – Triplo Quadrupolo

SCAN – Modo de Aquisição em Varrimento

TIC – Corrente Iónica Total

SIM – Modo seletivo de iões

DS – *Daughter Scan*

MRM – Monitorização de Reação Múltipla

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

MRC – Materiais de Referência Certificados

EIL – Ensaio Interlaboratorial

IPAC – Instituto Português de Acreditação

ISO – *International Organization for Standardization*

1 Introdução

A contextualização atual de um laboratório de análises ambientais coloca a entidade empresarial como uma infraestrutura de prestação de serviços e apoio a órgãos municipais, entidades concessionárias e indústria, no sentido de controlar parâmetros químicos e biológicos que determinam a qualidade da água fornecida às comunidades.

No laboratório de análise de águas são realizados ensaios nas áreas de química analítica e de microbiologia de águas com destino ao consumo humano, água como matéria-prima industrial, águas residuais e de processo, subterrâneas ou superficiais, e ainda incluída na rotina a participação em ensaios interlaboratoriais que visam assegurar a credibilidade e acreditação dos serviços prestados [1]. A instituição colabora com organismos estatais no desenvolvimento de projetos na área ambiental, como planos de monitorização da qualidade da água e avaliação do impacto da descarga de efluentes industriais e de estações de tratamento de águas no meio recetor.

Em Portugal, a qualidade da água disponibilizada para consumo humano deve cumprir as especificações requeridas na lei e controladas pela ERSAR (Entidade Reguladora dos Serviços de Água e Resíduos), a qual se constitui como um instituto público dotado de autonomia administrativa e financeira para a regulação dos serviços de abastecimento público e saneamento de águas residuais. As responsabilidades vinculadas a este organismo colocam-na como autoridade competente para a coordenação e fiscalização dos parâmetros a que deve atender a água com qualidade para consumo humano e animal [2,3]. De acordo com o disposto nos artigos 26.º e 27.º do Decreto-Lei n.º 306/2007, de 27 de agosto, e as alterações introduzidas pelo Decreto-Lei n.º 92/2010, de 26 de julho, a entidade ERSAR assume as funções de avaliar a aptidão dos laboratórios e realizar ações de supervisão (presencial ou documental) da sua atividade, com vista ao cumprimento dos requisitos legais aplicáveis [2,3].

No âmbito dos requisitos legais que definem a qualidade da água para abastecimento, as entidades gestoras de sistemas de abastecimento público devem disponibilizar água devidamente controlada, em qualidade e quantidade que satisfaça as necessidades básicas da população na sua área geográfica de influência. A legislação publicada em Diário da República estipula ainda que deve ser garantida a ausência de

microrganismos, parasitas ou substâncias indesejáveis potencialmente perigosas para a saúde [2,3].

De entre as substâncias orgânicas para as quais se encontram legislados os limites máximos a existir em águas, e por este motivo a necessidade de implementar práticas laboratoriais para o seu controlo, podem ser enumerados os pesticidas organofosforados e a acrilamida, estando neste trabalho contemplado o desenvolvimento e implementação de métodos analíticos para a sua determinação por cromatografia líquida com deteção por espectrometria de massa.

Os objetivos compreendem a extração dos analitos de matrizes aquosas e a compatibilidade da amostra preparada com o ensaio por métodos analíticos que se pretendem robustos, sensíveis e reprodutíveis, e com limites de quantificação que respeitem os critérios de desempenho analítico definidos na legislação, em termos de limiares analíticos, precisão e exatidão do resultados [3].

2 Compostos a estudar nesta tese

2.1 Pesticidas

2.1.1 Definição e contextualização do seu uso

O termo pesticida encontra-se definido pela Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) como “qualquer substância ou mistura de substâncias destinadas a prevenir, destruir ou controlar uma peste, podendo esta consistir em vetores de doenças humanas e animais, espécies não desejadas de plantas ou animais causadores de dano ou de qualquer outra forma interferentes com a produção, processamento, armazenamento, transporte e comercialização de produtos agrícolas, madeira ou alimento para animais, ou como substância que possa ser administrada a animais para o controlo de insetos, aracnídeos e outras pragas ou parasitas de que sejam alvo. A definição inclui no seu conteúdo o efeito como regulador do crescimento, desfolhante, dessecante ou agente de desbaste de frutos, preventivos da queda prematura de frutos, e ainda substâncias aplicadas às culturas para proteger os produtos da deterioração durante o seu armazenamento e transporte” [4].

A classificação dos pesticidas pode ser feita em função do alvo a que se destinam, sendo denominados de herbicidas, bactericidas, inseticidas ou fungicidas, ou com base na sua estrutura e composição química. A natureza química destes compostos é diversa, podendo ter origem inorgânica como o caso do arsenito de cobre, naturais como a nicotina ou as piretrinas, ou como exemplo serem obtidos por síntese orgânica de substâncias organocloradas, organofosforadas, carbamatos, ou piretróides como o caso de alguns inseticidas domésticos. A estrutura molecular e as propriedades podem variar, assim como a forma de apresentação em que são disponibilizados no mercado, existindo a maior parte na forma de pó/granulado ou de líquido concentrado [5–7].

A contextualização histórica do uso de pesticidas remete para a revolução industrial e produção primária intensiva, em que inicialmente eram usados essencialmente compostos inorgânicos de metais pesados como mercúrio, arsénio e chumbo, ou produzidos por extração de agentes naturais a partir de plantas [8]. Neste período a procura de inseticidas estava dirigida para a obtenção de moléculas estáveis e não tóxicas para o ser humano, sendo desenvolvido e amplamente disseminado o DDT

(diclorofenil - 2,2,2 - tricloroetano) na década de 40. Os efeitos de persistência no ambiente do DDT vieram a colocar em causa a sobrevivência de ecossistemas, pela elevadíssima estabilidade à degradação e efeito sobre insetos essenciais às cadeias tróficas e sobre espécies de aves, despertando para uma nova consciência acerca do uso de inseticidas. Os movimentos de proteção ambiental e o seu reflexo sobre a opinião pública acerca do uso desregrado de pesticidas contribuíram para a proibição do DDT em 1972 [9].

A produção exponencial de compostos sintéticos prevaleceu até aos anos 80, refletindo o recurso a pesticidas nas atividades económicas agrícolas, e representa ainda hoje níveis de consumo com elevado significado [10]. A Agência de Proteção Ambiental do Estados Unidos (EPA) contabiliza que nas duas últimas décadas tem ocorrido um ligeiro decréscimo no uso de pesticidas a nível global, como consequência de leis que restringem o seu uso descontrolado, e uma maior consciencialização das populações e práticas de agricultura biológica [11].

O recurso a entidades químicas para o controlo de pragas contribui para um aumento da produtividade e rentabilidade da produção agrícola. No entanto, a dispersão e acumulação de pesticidas no meio ambiental afeta os ecossistemas, desequilibrando de forma por vezes irreversível as cadeias tróficas e a biologia das espécies [8,11–13]. Os resíduos gerados por estas substâncias tornaram-se um problema emergente, com o número de compostos orgânicos a serem detetados em águas de superfície e subterrâneas a levantar preocupações acerca da contaminação dos reservatórios de água [12,14]. O impacto ambiental e na saúde pública constituem um fator determinante para que a União Europeia (EU) tenha incluído os pesticidas na lista de poluentes prioritários (2000/60/EC) [14]. As substâncias ativas autorizadas a serem incluídas em formulações fitofarmacêuticas estão enumeradas na denominada *Lista Positiva Comunitária*, constante da diretiva Europeia 1107/2009, estando a lista de substâncias sujeita a revogação e atualização pelo decreto comunitário n.º 80/2011, de 20 de Junho [15]. As preparações fitofarmacêuticas comercializadas em Portugal são controladas pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), coordenada pelo Ministério da Agricultura, Mar e Ordenamento do território, em concordância com o decreto-lei n.º 94/98 de 15 de Abril, e desde 14 de Junho de 2011 pelo Regulamento (CE) n.º 1107/2009 de 21 de outubro, ao abrigo dos quais se efetuam os pedidos de autorização

de venda, autorização de comércio paralelo ou de alargamento de espectro de utilização dos produtos fitofarmacêuticos [15].

A pesquisa de pesticidas em águas destinadas ao consumo está presentemente regulada pelo Decreto-Lei nº 306/2007 de 27 de Agosto, que estabelece o regime de qualidade da água com o objetivo de proteger a saúde humana dos efeitos nocivos resultantes da exposição a contaminantes, e ainda assegurar a disponibilização às populações de água salubre, limpa e desejavelmente equilibrada na sua composição [3].

A abordagem eleita para a avaliação dos níveis de pesticidas refere que as entidades gestoras devem exercer uma atividade de controlo sobre aqueles que possam existir numa determinada zona de abastecimento, tomando em consideração as atividades económicas das áreas circundantes e a proveniência das águas. A adequação da amostragem e obrigatoriedade das análises a realizar devem ter em consideração as atividades agrícolas e a distribuição dos compostos nos seus potenciais reservatórios, atentando às características físico-químicas que condicionam a persistência e mobilidade [16]. Neste contexto, foi atribuída à Direção Geral de Alimentação e Veterinária a competência de publicar até 31 de Julho de cada ano os pesticidas a controlar pelas entidades gestoras no ano seguinte, e os períodos temporais mais adequados para a sua amostragem e análise [16].

O ometoato é um dos pesticidas organofosforados especificados pela ERSAR para controlo obrigatório em águas destinadas ao consumo humano em 2014, sendo esta uma substância contida em diversas formulações comerciais de utilização como inseticida e acaricida em produção agrícola, jardins particulares e hortas [16,17].

Os valores paramétricos de um determinado são genericamente definidos como os limites legais de concentração permitidos para substância ativas, iões, metabolitos ou produtos de degradação/reação a existirem na matriz a que estão referenciados. A Diretiva Europeia 98/83/EC, transposta para Portugal no Decreto-Lei nº 306/2007 de 27 de Agosto em Diário da República, estipula que individualmente um resíduo de pesticida não pode existir em água destinada ao consumo humano em concentrações superiores a 0,10µg/L, e a soma total de pesticida não pode exceder os 0,50µg/L [3].

2.1.2 Compostos organofosforados

2.1.2.1 Estrutura molecular e mecanismo de ação para a toxicidade

Os pesticidas organofosforados são compostos orgânicos caracterizados de modo geral como derivados da estrutura do ácido fosfórico ou tiofosfórico, com a fórmula molecular apresentada na Figura 1, em que R1 e R2 podem corresponder a grupos alquilo ou alcoxilo de cadeia curta, ou ainda resíduos de aminoácido, e X a um grupo facilmente substituído ou removido. O fósforo pentavalente está ligado a um átomo de oxigênio, ou alternativamente a enxofre para os compostos que exibem maior toxicidade após a bioativação [18–20].

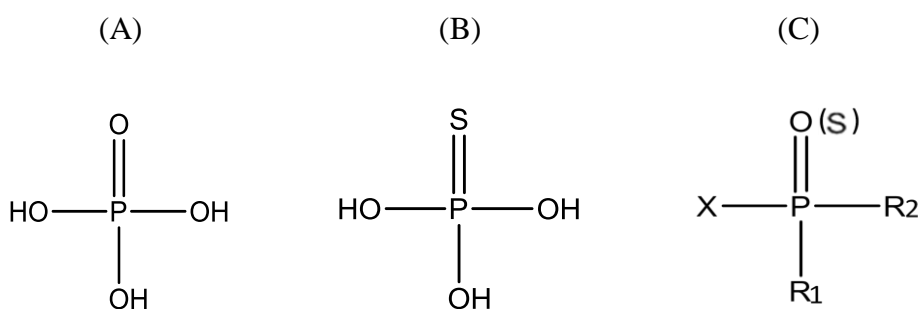


Figura 1 - Estruturas do ácido fosfórico (A), ácido tiofosfórico (B), estrutura geral dos pesticidas organofosforados (C).

Os grupos substituintes determinam uma ampla gama de propriedades físicas, estabilidade química e biológica, seletividade e toxicidade [18,20]. A elevada toxicidade humana e animal determinou que a classificação de risco estabelecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) coloque os compostos organofosforados nas duas classes de maior importância, pela relação com a maior potência destes compostos e menor dose necessária para que seja exibida a toxicidade [20,21].

O mecanismo de ação dos inseticidas organofosforados compreende a transferência de um grupo fosfato para o local ativo da enzima acetilcolinesterase (ACE), com formação de uma ligação de elevada afinidade e hidrólise muito lenta, pelo que se denominam comumente os pesticidas organofosforados de inibidores “irreversíveis” da acetilcolinesterase [18,22,23].

A acetilcolinesterase é uma enzima que se localiza na membrana pós-sináptica da transmissão do impulso nervoso, tendo ação de catalisar a rápida decomposição do neurotransmissor acetilcolina, substrato endógeno que se encontra protonado a pH

fisiológico. A enzima possui na sua estrutura dois centros ativos, o centro aniônico carregado negativamente e o centro esterático onde se expõe um resíduo do aminoácido serina [22].

A representação esquemática da interação entre a ACE e o substrato natural acetilcolina pode ser observada na Figura 2. Numa primeira etapa, a porção da acetilcolina carregada positivamente é atraída pelo centro aniônico da enzima, enquanto um par de elétrons não ligantes do oxigénio da serina realiza o ataque nucleofílico ao carbono polarizado positivamente da molécula de acetilcolina [22].

Ocorre a esterificação com o resíduo de serina e a reação é acompanhada da produção de colina, sendo que a atividade da ACE é seguidamente restaurada por hidrólise da ligação éster e regeneração da enzima, com produção de ácido acético [22].

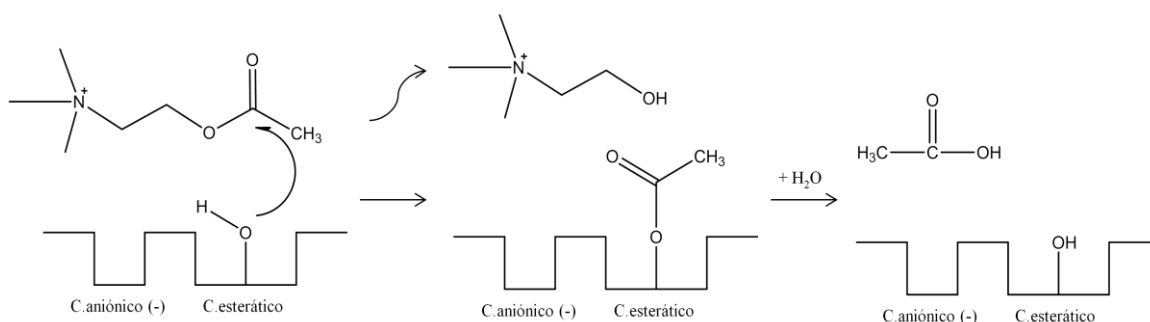


Figura 2 – Interação da acetilcolina com a ACE.

Os compostos organofosforados mimetizam a molécula de acetilcolina, uma vez que são captados pela enzima ACE e há uma interação análoga à ocorrida com o substrato natural. Pode ser observado na Figura 3 que, como resultado do ataque nucleofílico do oxigénio da serina ao átomo de fósforo, ocorre a fosforilação da enzima. No entanto, a regeneração da ACE por hidrólise do grupo fosfato é muito lenta, em contraste com a cinética da reação de degradação da acetilcolina catalisada pela ACE, com o elevado *turnover* de 25000 moléculas por segundo [22,24,25].

A enzima fosforilada não apresenta capacidade catalítica, pelo que a sua inativação gera a acumulação de acetilcolina na fenda sináptica, conduzindo ao choque colinérgico por não haver interrupção da atividade do neurotransmissor. A disrupção fisiológica causada pelo tóxico causa sintomas de super-estimulação colinérgica, e em última estância bloqueio da ação do músculo liso, nomeadamente o diafragma, conduzindo a depressão da função respiratória e morte [20,22,24].

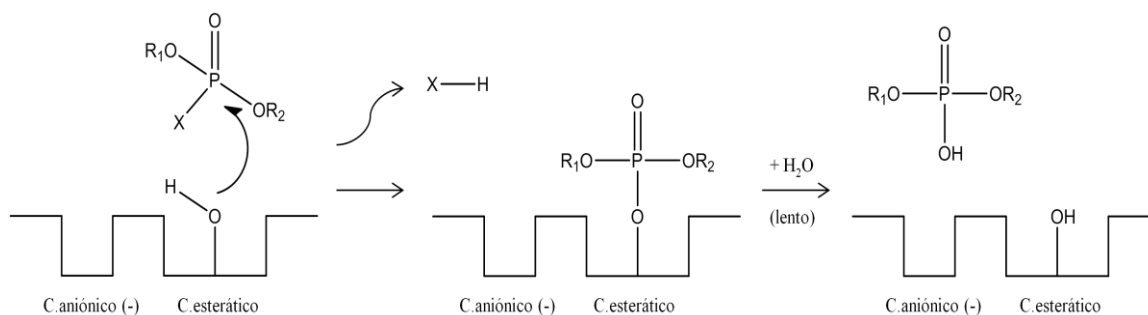


Figura 3 – Interação de compostos organofosforados com a ACE.

Considerando a relação estrutura-atividade dos compostos organofosforados, existe uma dependência entre a presença de grupos volumosos ligados ao fósforo e a capacidade de este sofrer o ataque nucleofílico, pelo que o impedimento estereoquímico e a inacessibilidade do resíduo de serina ao átomo de fósforo são evitados por a maioria das estruturas possuir grupos alcóxido de cadeia curta nas posições R₁ e R₂, mais especificamente metóxido e etóxido [22].

Os tiofosfatos (P=S) exibem baixa toxicidade, mas são convertidos a nível hepático no análogo fosfato (P=O) por oxidação (Figura 4). A conversão do tiofosfato em fosfato corresponde a uma reação de dessulfuração oxidativa da Fase I do metabolismo, catalisada por oxidases não específicas do sistema do citocromo P-450 [21,24,26].

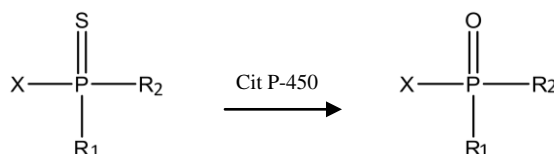


Figura 4 – Bioativação de compostos organofosforados pelo Cit P-450.

Com foco no determinando da metodologia a implementar, são abordadas seguidamente (Figura 5) as características relevantes de estrutura química e toxicidade do pesticida ometoato, assim como a sua relação com o análogo sulfurado dimetoato:

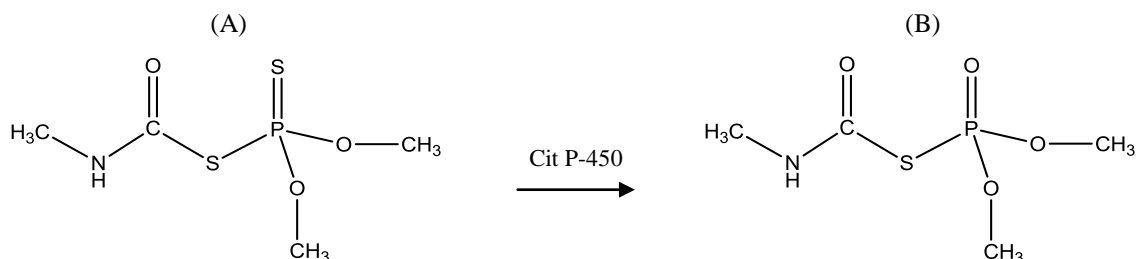


Figura 5 – Estrutura química dos compostos organofosforados dimetoato (A) e ometoato (B), conversão por bioativação.

O dimetoato tem uma estrutura química de tiofosfato, com o substituinte metiltioacetamida na posição X e dois grupos alifáticos metoxilo ligados ao fósforo. O composto aplicado exibe menor toxicidade, sofrendo ativação *in vivo* pelos sistemas metabólicos e conversão no análogo oxigenado, correspondente ao ometoato. A bioativação do dimetoato, com a substituição do enxofre do grupo tiofosfato por oxigênio, influencia determinantemente a reatividade da molécula ao afetar a eletrofilicidade do átomo de fósforo central, a qual é simultaneamente condicionada pela eletronegatividade dos átomos ou grupos vizinhos. Como consequência, na formação da ligação éster com a serina, o grupo fosfato apresenta uma muito maior reatividade, comparativamente ao tiofosfato [22,23].

Caraterização físico-química do ometoato

O ometoato é um organofosfato de origem sintética com atividade inseticida e acaricida que se apresenta à temperatura ambiente como um líquido oleoso incolor ou amarelado, de odor mercaptânico, sendo comumente comercializado em apresentações na forma de líquido concentrado, conservadas a temperaturas entre 0°C e 6°C [21,27,28].

Os métodos químicos de produção enunciados referem a reação de ácido *O,O*-dimetilfosforilmercaptoacético com isocianato de metilo, ou preparado por reação de ácido *O,O*-dimetilfosforotiólico com 2-cloro-*N*-metilacetamida [21].

Nome IUPAC: 2-dimetoxifosforilsulfanil-*N*-metilacetamida

CAS- Chemical Abstract Service No.: 1113-02-6

Fórmula Molecular: C₅H₁₂NO₄PS

Peso Molecular: 213,191841 g/mol (monoisotópica)

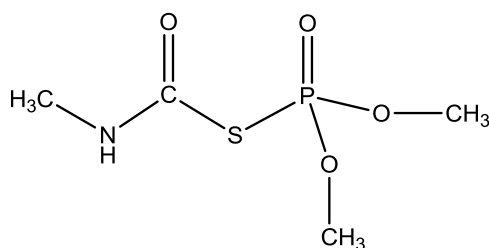


Figura 6 – Fórmula de estrutura do ometoato.

Tabela 1 – Resumo de características do ometoato [21,27,28].

Sinónimos	Ometoato, dimetoxão, dimetoato oxão, Folimato, O,O-dimetil-S-metilcarbamoilmetilfosforotioato
Impurezas (formulações concentradas)	Ometoato: pureza mínima 94,5% O-desmetilometoato (máx. 2,0%) Dimetilfosfite (máx. 2,0%) Solventes (máx. 2,0%)
Coefficiente de Partição Octanol-Água (K_{ow}) pH=7 e temperatura 20°C	$K_{ow}=1.82 \times 10^{-01}$ Log $K_{ow} = -0,74$
Solubilidade em água	O baixo valor de Log K_{ow} faz prever a elevada solubilidade em água, com mais de 200g de substância a serem solubilizados por litro de solvente, à temperatura ambiente
Solubilidade em solventes orgânicos (ordem crescente para o composto puro)	Inferior a 0,1g/L em hexano 50 a 100 g/L em tolueno Miscível com diclorometano, 2-propanol, acetona e metanol
Ponto de fusão	-28°C
Ponto ebulição	135°C
Pressão de Vapor do Composto Puro	$3,3 \times 10^{-5}$ mbar, a 20 °C

O coeficiente de partição é um parâmetro sem unidades, e que constitui um preditor de propriedades físicas para a maioria dos pesticidas e outras substâncias orgânicas com peso molecular inferior a 500Da [29]. A amplitude de valores de K_{ow} para os compostos orgânicos pode ser muito ampla, sendo por conveniência frequentemente expresso como Log K_{ow} e com os valores a variarem entre -3 e 7 [29]. Este parâmetro constitui um bom indicador para prever a bioacumulação nos organismos e cadeias tróficas, estando diretamente relacionada com valores elevados de K_{ow} e afinidade para depósitos oleosos [29]. Com foco na expressão de cálculo anteriormente apresentada pode facilmente concluir-se que os valores de K_{ow} são influenciados pela polaridade do pesticida, determinando que a maior solubilidade em água se traduz por um baixo valor de K_{ow} e compreendendo que o aumento de propriedades como a área de superfície, peso molecular e volume molar fazem aumentar o valor de K_{ow} por diminuição da hidrofília dos compostos [29].

Os estudos toxicológicos consideram aspetos relevantes para a saúde humana e animal, como a absorção, distribuição e transformação dos compostos, e efeitos de toxicidade aguda ou exposição subaguda repetida a curtos intervalos de tempo, contemplando ainda os efeitos nefastos resultantes da exposição crónica e a bioacumulação. Geralmente são avaliados os efeitos produzidos a nível do sistema nervoso central, hematológicos, sistema reprodutivo, e ainda o estudo da carcinogenicidade [20,21,30]. A informação compilada para o ometoato refere uma dose tóxica aguda elevada em mamíferos e aves, indicando quantidades moderadas para a toxicidade em algumas espécies de peixes. Os estudos em modelos animais, especificamente em ratinhos,

indicam uma LD₅₀ de 50,0 mg. kg⁻¹ por via oral, e uma LD₅₀ de 145,0 mg. kg⁻¹ quando considerada a absorção dérmica. Experiências relativas à exposição por inalação determinaram uma LC₅₀ atmosférica de 0,3 mg. L⁻¹. O cálculo da ingestão diária aceitável (ADI – *Admissable Daily Intake*) resultou no valor de 0,0003 mg. Kg⁻¹ de peso corporal. dia⁻¹. O valor estipulado para a ADI deriva da aplicação de um fator de segurança com o desdobramento de 100x, baseado no nível NOEL (*Non Observed Effect Level*) de não observação de efeito inibidor da colinesterase, avaliado num estudo da toxicidade oral em cães com a duração de 1 ano [21,26].

A instituição do valor paramétrico para compostos organofosforados individualmente tem por base a ADI e o consumo diário recomendado de água para um humano de 70kg de peso. No entanto, não deve ser desconsiderado o efeito aditivo resultante da interação do ometoato e de outros compostos organofosforados eventualmente presentes, pelo que a legislação define os valores máximos de concentração para estes compostos individualmente, e para o total de pesticida em águas destinadas ao consumo [3,26].

2.1.2.2 Perfil de risco toxicológico e biotransformação

Farmacodinâmica e toxicocinética

Os eventos que compreendem a absorção, transporte e localização das substâncias dentro do organismo constituem a farmacodinâmica [24].

Todas as transformações químicas ocorridas sobre um composto a nível biológico, afetando a sua atividade farmacológica ou determinando a modificação das suas características para consequente eliminação, constituem a farmacocinética [24].

A toxicidade exibida por uma substância está dependente de fatores como a dose, via de administração, absorção e aspetos relativos ao organismo em causa e suas condicionantes individuais. A estrutura molecular do composto e a capacidade e especificidade metabólicas do organismo alvo serão determinantes para a biotransformação e eliminação do xenobiótico, condicionando ainda a potencial deposição em tecidos corporais [24,31].

Os processos descritos no ciclo ADME – Absorção, Distribuição, Metabolismo e Eliminação (Figura 7) – estão relacionados e podem influenciar a eliminação mais ou

menos rápida dos compostos, sendo que a manifestação do efeito farmacológico dependerá da disponibilidade de uma droga para ser transportada através do sangue e difundida para os locais alvo, ou para os órgãos onde ocorre a transformação ou deposição [24]. A existência de afinidade de uma droga para um tipo de tecido, comumente o adiposo ou nervoso, constitui um fator de importante consideração, uma vez que pode determinar a bioacumulação e condicionar o efeito da droga ou a sua transformação [24,31].

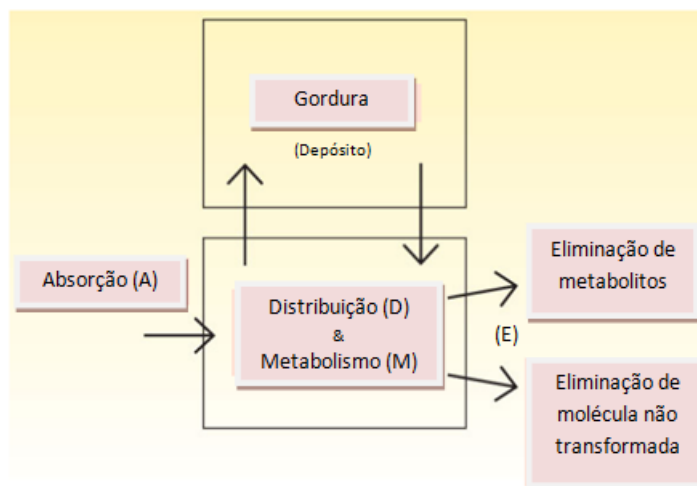


Figura 7 – Representação da absorção e destino de xenobióticos no organismo (ADME).

Seguidamente são apresentadas breves considerações acerca da Absorção, Distribuição, Metabolismo e Eliminação de compostos organofosforados, e mais especificamente do ometoato, em mamíferos.

Absorção

A entrada de substâncias no organismo, com passagem para a circulação sistêmica denomina-se absorção, estando a velocidade e extensão do processo dependentes da via de administração: ingestão, inalação, dérmica ou injeção (intravenosa, intramuscular ou subcutânea). A absorção através da pele é mais difícil e lenta, constituindo a epiderme a principal barreira aos xenobióticos e micro-organismos [24,31].

A circulação entero-hepática traduz uma etapa especial de absorção, em que o composto excretado na biliar na forma original não transformada é reabsorvido no intestino delgado, retornando à corrente sanguínea. Este fenómeno ocorre preferencialmente para

moléculas suficientemente lipofílicas e que atravessam as vilosidades intestinais, não constituindo portanto importância significativa para o ometoato [21,24,31].

A rapidez de absorção dos pesticidas organofosforados pode ser promovida pela sua ingestão ou aplicação com solventes orgânicos. De modo transversal para esta classe de compostos, o ometoato é rapidamente absorvido através das membranas mucosas do sistema digestivo, pulmões, conjuntiva e pele, sendo que a taxa de absorção dérmica pode ser influenciada pelo solvente em que se encontram. Relativamente à biodisponibilidade oral, a absorção é praticamente completa, com apenas 2% da quantidade administrada nas fezes, e níveis plasmáticos máximos ao fim de 1 hora [21].

Distribuição

O xenobiótico ou droga absorvidos são transportados pela corrente sanguínea aos vários tecidos do organismo, podendo neste decurso encontrar barreiras de natureza lipofílica, como a barreira hemato-encefálica (BHE). A passagem de substâncias exógenas, do sangue para as células do tecido alvo dá-se essencialmente por mecanismos de difusão passiva [24]. O transporte das substâncias para os tecidos depende da sua afinidade para essa matriz, e de fatores como a dimensão da molécula, grau de ionização, e captura/transporte dos compostos por ligação a proteínas plasmáticas (em equilíbrio com a concentração sanguínea) como por exemplo a albumina [24,31]. As moléculas hidrófilas têm dificuldade em atravessar a dupla camada fosfolipídica, ocorrendo a sua entrada na célula por transportadores ou recetores de membrana, em semelhança com os iões que são captados de forma passiva ou permeados através de transportadores de membrana canal. Por outro lado, os compostos lipossolúveis apresentam um elevado coeficiente de partição e são transportados facilmente, podendo acumular-se de modo preferencial no tecido adiposo, onde formam depósitos [24].

A distribuição dos compostos organofosforados a todo o organismo através da circulação sistémica faz com que os efeitos tóxicos se manifestem rapidamente, demorando mais tempo a serem atingidos os níveis plasmáticos quando a via de administração/absorção é transdérmica, ou quando a manifestação do efeito tóxico depende da bioativação do tóxico [22,31].

Coerentemente com a elevada solubilidade em água, um estudo farmacodinâmico realizado em ratinhos com ometoato veiculado na forma de solução aquosa mostra a rápida e praticamente completa absorção gastrointestinal. A marcação radioativa da molécula permitiu observar que o pico de concentração plasmática foi atingido cerca de uma hora após a ingestão, acompanhado de distribuição disseminada pelos tecidos corporais através do sistema circulatório, com a maior concentração a ser encontrada na tiróide, e níveis hepáticos, renais, testiculares, esplênicos e pulmonares superiores aos plasmáticos, evidenciando a afinidade do composto para estes órgãos [21]. O baixo valor de K_{ow} para o ometoato expressa a sua natureza hidrófila, fator que contribui para a inexistência de bioacumulação por exposição repetida a quantidades residuais ao longo do tempo [21,27].

Metabolismo

A lipofilia das moléculas que constitui um fator importante na absorção e distribuição das drogas é alterada por transformação essencialmente hepática. O metabolismo conduzido pelos sistemas enzimáticos hepáticos tem como objetivo alterar a estrutura dos compostos, de modo a facilitar a sua eliminação. A biotransformação não implica necessariamente que os produtos resultantes exibam menor toxicidade ou efeito, podendo o aumento da hidrofília corresponder à geração de espécies inclusivamente mais nocivas que os originais [22,24,31].

A transformação de xenobióticos pode ocorrer de forma menos significativa em órgãos como o rim ou trato gastrointestinal, nos quais podem existir isoenzimas da família do sistema microsomal hepático. Algumas substâncias podem ser excretadas na forma original, como a eliminação do etanol por via pulmonar [24,31].

A nível do sistema hepático de destoxificação, os compostos organofosforados são degradados rapidamente e eliminados preferencialmente pela via urinária. O metabolismo consiste essencialmente em duas etapas:

Fase I – As moléculas são convertidas em intermediários funcionalizados, contendo grupos hidrófilos, através de vias metabólicas do sistema do citocromo P-450 que catalisam reações de oxidação, redução ou hidrólise [24]. Os produtos da fase I irão depender em parte dos substituintes alcóxilo ligados ao fósforo, determinando que do

metabolismo de vários compostos organofosforados possam resultar produtos comuns, normalmente alquilfosfatos e alquiltiofosfatos (Figura 8) [32,33].

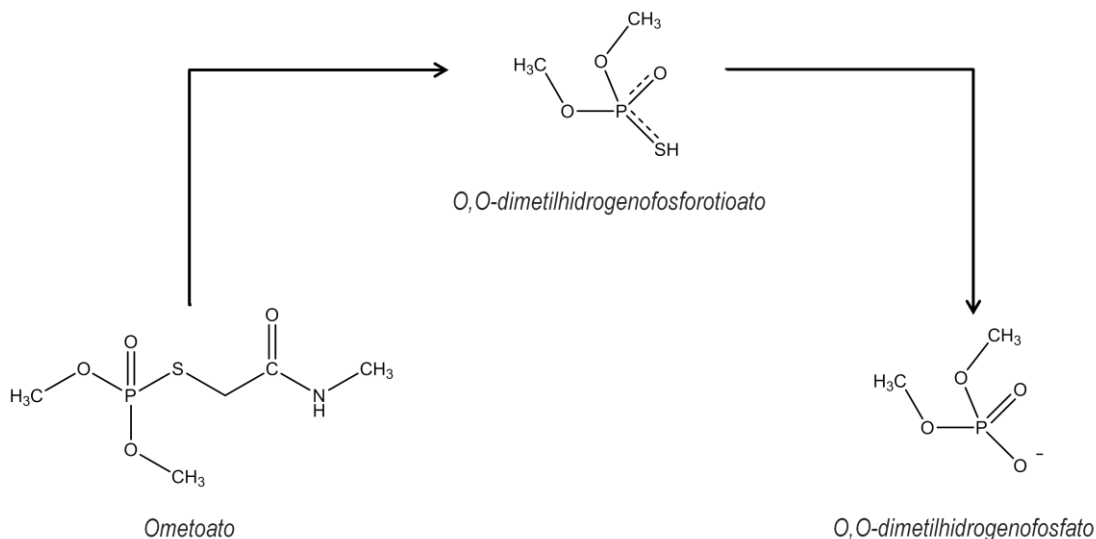


Figura 8 – Principais metabolitos de fase I do ometoato em mamíferos [34].

Fase II – A Fase II do metabolismo compreende essencialmente reações de conjugação, onde o composto ou seus metabolitos são ligados através dos grupos funcionais a substratos endógenos, transportados na forma de co-fatores [24].

O ometoato na forma original e os seus metabolitos sofrem uma reação de adição do substrato endógeno ácido uridino difosfatoglucurônico – UDPGA, mediada pela enzima glutathione transferase, resultando num aumento da hidrofilia dos produtos e passagem para a urina, com consequente eliminação [24,31].

Eliminação

A reatividade metabólica determina que não ocorram em mamíferos problemas de bioacumulação e transferência ao longo do tempo, através das cadeias tróficas. A marcação com radioisótopos possibilitou a monitorização da rápida eliminação renal do ometoato, em que mais de 96% da dose oral foi colhida na urina no período de 48h após administração, evidenciando o baixo potencial para bioacumulação do composto em tecidos corporais ou órgãos, mesmo após exposição repetida. A grande maioria da quantidade administrada foi excretada na urina nas primeiras 12h, com uma pequena fração a ser eliminada nas fezes e ar expirado [21,27]. Entre 25-40% do ometoato é

eliminado por via urinária na forma não transformada, dependendo da variabilidade individual [21,27].

2.1.2.3 Destino ambiental e potencial de exposição

A multiplicidade de substâncias poluentes encontradas em quantidades vestigiais no ar, águas, solos ou sedimentos podem representar um impacto significativo no equilíbrio dos ecossistemas, pelo seu efeito interativo e/ou acumulação. A importância destes efeitos ou a gravidade da exposição dependem da natureza química das substâncias e do organismo alvo, devendo ser considerados aspetos como a concentração atingida no ambiente e a capacidade de penetração ou assimilação do tóxico nos organismos [28,35].

O desenvolvimento de pesticidas potencialmente menos persistentes e com menor impacto nos ecossistemas não invalida a exibição de toxicidade para os organismos vivos, e que resíduos destes possam ser encontrados em reservatórios de água e particulados no ar atmosférico [28,35]. O arrastamento ou lixiviação das substâncias de solos agrícolas para os lençóis freáticos determina a necessidade de controlar a sua presença e o nível de resíduos nas águas de abastecimento destinadas às populações [16,28,35,36]. A estreita correlação encontrada entre a presença de ometoato em solos e a precipitação atmosférica indica que a solubilidade do composto em água é um dos principais fatores a afetar a sua dissipação. Deste modo, o ometoato e dimetoato estarão mais disponíveis em matrizes aquosas, pela relação com os baixos valores de coeficiente de partição ($\log K_{ow}$) e consequente mobilidade elevada nos solos [28,36,37].

Os estudos empreendidos acerca da volatilização do ometoato em solos húmidos e secos mostraram que a passagem para a fase gasosa não parece ser um destino importante para os resíduos deste pesticida, enquanto a biodegradação aparenta ter efeito muito relevante para a eliminação do composto, por comparação dos resultados de degradação encontrados para análogos de dimetoato em solos argilosos e em amostras do mesmo sujeitas a autoclavagem ou irradiação. O ometoato exibiu um decréscimo de 77% no período de duas semanas, para a amostra de solo não tratada, enquanto no solo esterilizado a decomposição rondou os 19% [27,35]. Em analogia, os tempos de

semivida observados para o ometoato em águas filtradas e não filtradas evidenciam a atividade biológica como relevante para a decomposição ambiental de ambos os análogos estruturais. As referências indicam a decomposição rápida em sedimentos, essencialmente por biotransformação, com degradação de 50% da quantidade inicial (DT_{50}) em 4,5 dias [38]. A degradação aeróbia em solos compreende uma redução de cerca 50% da quantidade (DT_{50}) em 14 dias [27].

Em ambiente aquático, a informação apresentada na literatura [28] indica que não é de esperar a adsorção do ometoato por partículas suspensas, assim como não é expectável a sua volatilização, com base nos valores de K_{ow} e constantes da pressão de vapor. O composto apresenta ainda estabilidade fotoquímica em solução aquosa, para radiação com comprimento de onda superior a 290 nm, ocorrendo a decomposição de cerca de 50% da quantidade de ometoato em 26 dias, por hidrólise a pH=7 [27,28,37].

A elevada mobilidade do ometoato nos solos e relativa persistência na água, mesmo a níveis baixos de concentração, determinam que esteja incluído na lista de poluentes prioritários a determinar em águas destinadas ao consumo, de acordo com as diretivas Europeias que referenciam o controlo da qualidade da água [21,35,39]. A revisão legal dos pesticidas de pesquisa obrigatória determinou que o ometoato seja avaliado em conjunto com o dimetoato, como consequência da biotransformação do dimetoato aplicado às culturas poder contribuir para a quantidade de ometoato usado diretamente como inseticida [17,40]. O ometoato pode ainda existir como impureza em formulações comerciais de dimetoato, num máximo de 2%, não adquirindo importância relevante [27,28,40].

2.2 Acrilamida

2.2.1 Origem no ambiente e enquadramento legal

A acrilamida (AA) é a unidade monomérica da poliacrilamida, um polímero que tem utilização como agente clarificante de águas residuais e águas destinadas ao consumo humano, entre outras aplicações industriais [41,42]. Os processos de tratamento de águas e a produção de plásticos e resinas constituem as principais fontes deste monómero no ambiente, estando a acrilamida classificada como provável carcinogénico

humano (grupo 2A) pela Agência Internacional para a Investigação do Cancro e pela Organização Mundial de Saúde, que estabelecem uma probabilidade de risco em desenvolver cancro de 10^{-5} no tempo de uma vida, para concentrações de $0,50\mu\text{g/L}$ de AA em água destinada ao consumo [41–44]. A dose máxima autorizada de polímero no tratamento de águas é de 1mg/L , com impureza de monómero de 0,05%, o que corresponde a uma concentração teórica máxima de $0,50\mu\text{g/L}$ de AA em água, podendo no entanto os valores reais observados ser duas ou três vezes inferiores [45]. A descoberta da presença de AA em alimentos processados determinou a subsequente classificação deste poluente como contaminante prioritário em 2008 [46–48].

De acordo com a Agência de Proteção Ambiental do Estados Unidos da América, as descargas de AA da indústria para o ambiente totalizaram 315 mil toneladas em 2010, apenas no país, com mais de 98% a ser direcionada para reservatórios de água subterrâneos [49]. Neste contexto, a EPA estabeleceu como zero o objetivo para o nível máximo deste contaminante, e exige que os serviços de abastecimento de água demonstrem a inexistência de acrilamida em concentrações superiores ao valor paramétrico legislado de $0,50\mu\text{g/L}$ [43].

A nível Europeu, a avaliação de risco ambiental e para a saúde pública tem em consideração as grandes quantidades produzidas ou importadas anualmente, rondando os 10×10^4 kg [50]. O teor máximo de AA a existir em águas destinadas ao consumo humano e animal encontra-se regulamentado na União Europeia pela Diretiva EU 98/83, que estabelece como requisito mínimo para a qualidade o valor paramétrico de $0,10\mu\text{g/L}$ [3,39].

A determinação dos níveis vestigiais desta substância em água encontra dificuldades técnicas de execução, particularmente devido à elevada solubilidade da acrilamida em água, fator que limita a adequação e eficácia dos métodos de pré-concentração das amostras [51]. Neste sentido adquire importância o desenvolvimento de um procedimento analítico expedito, altamente sensível e robusto para a determinação das quantidades vestigiais de acrilamida a existirem, como parte da rotina de um laboratório de análises.

2.2.2 Caraterização físico-química

A acrilamida (Figura 9) apresenta-se como um sólido cristalino, inodoro, de cor transparente a branca, que sublima lentamente à temperatura ambiente. O composto pode ser purificado por cristalização de solução em benzeno, formando cristais com aspeto de flocos. A estabilidade da molécula de acrilamida depende principalmente da temperatura, uma vez que para aquecimento superior ao ponto de fusão ocorre a reação exotérmica de polimerização para formar poliacrilamida, o que impede a determinação do ponto de ebulição à pressão atmosférica. A radiação ultravioleta provoca igualmente a polimerização da acrilamida, pelo que as soluções comerciais são estabilizadas com sais cuprosos, *tert*-butilpirocatecol, ou outros antioxidantes. A estabilidade do composto sólido pode ser conseguida por armazenamento em local fresco e seco [50].

Nome IUPAC: Acrilamida

CAS- Chemical Abstract Service No.: 79-06-1

Fórmula Molecular: C₃H₅NO

Peso Molecular: 71,06 g/mol

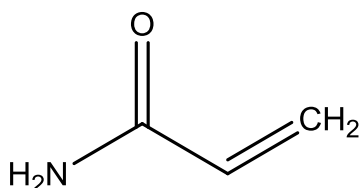


Figura 9 – Fórmula de estrutura da acrilamida.

Tabela 2 – Caraterização físico-química da acrilamida [52,53].

Sinónimos	2-propenamida, amida acrílica ácida, etileno carboxamida, amida propenoica ácida, amida vinílica
Formas de apresentação	Sólido (pó): pureza 98% m/m Solução aquosa: 30-60% m/m
Produção	Hidratação do acrilonitrilo
Principais impurezas (%m/m relativamente ao composto sólido)	3-hidroxiopropionitrilo < 0,5% 3-hidroxiopropionamida < 0,5% Ácido acrílico < 0,3% Tris-nitrilopropionamida < 0,3% Acrilonitrilo < 0,1% Água < 1%

O ácido acrílico e tris-nitrilopropionamida são subprodutos da reação de polimerização para obtenção de poliacrilamida, enquanto o acrilonitrilo corresponde a matéria-prima não transformada no processo.

Ponto de fusão	84.5°C
Ponto de ebulição	125°C a pressão reduzida de 25 mm Hg ou 3.3 kPa
<p>Em 1991 Kirk-Othmer definiu uma gama de temperaturas de ebulição para diferentes pressões operadas:</p> <p>116.5°C a 1.4 kPa</p> <p>103°C a 0.67 kPa (5 mm Hg)</p> <p>87°C a 0.27 kPa (2 mm Hg)</p> <p>No entanto, estas condições correspondem a referências gerais e devem ser cuidadosamente consideradas. A tendência da acrilamida em polimerizar para temperaturas superiores ao ponto de fusão determina que o seu ponto de ebulição esteja estabelecido para pressões inferiores à atmosférica.</p>	
Densidade	1.127 g.cm ⁻³ a 25°C
Pressão de vapor	Estabelecida em 0.9 Pa a 25°C para o composto sólido
<p>A elevada densidade de vapor da acrilamida (2,46) coloca o composto como mais pesado que o ar, pelo que será propícia a acumulação à superfície do sólido ou solução, sem que se observe a dispersão no ar.</p>	
Solubilidade (30°C)	<p>Água – elevada: 216g AA/100g</p> <p>Metanol – 155g AA/100g</p> <p>Etanol – 86,2g AA/100g</p> <p>Acetona – 63,1g AA/100g</p> <p>Acetato de etilo – 12,6 g AA/100g</p> <p>Pouco miscível:</p> <p>Benzeno – 0,35g AA/100g</p> <p>Heptano – 0,0068g AA/100g</p>
Valores estimados utilizando acrilamida recristalizada seca sob vácuo, e solventes secos.	
Coefficiente de partição Octanol-Água (Kow)	Log (Kow) = -1,0

3 Preparação de amostras

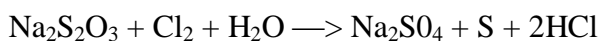
3.1 Amostragem e conservação das amostras

O planeamento da amostragem visa garantir a representatividade das alíquotas, enquanto os procedimentos de colheita e conservação são fundamentais para a manutenção das propriedades e composição química da amostra entre a recolha e a sua preparação ou análise, na maior medida possível. A preservação da amostra implica a escolha de contentores adequados, compostos por materiais que não reajam, cedam ou capturem substâncias que determinam a adulteração da amostra, assim como dos aditivos necessários para manter as condições propícias à estabilidade e disponibilidade dos analitos, quando armazenadas nas condições de luz e temperatura especificadas. Uma condição particular a observar é o tipo de lavagem ou tratamento ao qual o contentor deve ser submetido previamente à colheita [54]. O armazenamento preferencial a temperaturas baixas reduz a velocidade de degradação, aumentando a estabilidade e o tempo de conservação permitido até processamento ou análise [19,35,54].

3.1.1 Compostos organofosforados

Para a determinação desta classe de compostos em águas de consumo foi estabelecida a colheita das amostras em contentores de vidro para os quais foi pesada previamente uma quantidade adequada de tiosulfato de sódio, utilizado como conservante. A adição do conservante assume uma função estabilizante por remover o cloro ativo em solução e evitar a interferência causada por este, o qual promoveria a hidrólise das moléculas de pesticida [55,56]. A hidrólise promovida pela ação do cloro foi evidenciada por *Edwards et al* [57] ao investigarem os fatores que determinam a reatividade de nucleófilos. Os três pares de eletrões desemparelhados existentes no ião hipoclorito conferem a elevada nucleofilicidade direcionada a átomos ou grupos funcionais específicos, como o fósforo tetraédrico de ligações fosfoéster ou grupos carbonilo [57].

O tiosulfato neutraliza as moléculas de cloro ou cloramina utilizados como desinfetante, de acordo com as equações [58]:



Adquire importância a manutenção da temperatura entre 2°C e 8°C durante o transporte e armazenamento das amostras, uma vez que a baixa temperatura inibe ou retarda o desenvolvimento microbológico, assim como os processos físico-químicos de degradação do composto [27,54]. Por este motivo é recomendável que se realize o processamento ou extração das amostras com a maior brevidade possível após a sua chegada ao laboratório, não devendo exceder o período máximo de 7 dias [54,55].

3.1.2 Acrilamida

A estabilidade das amostras de água para determinação de acrilamida deve ser promovida por colheita em contentores de vidro âmbar, sem adição de conservante. As amostras devem ser transportadas e armazenadas sob condições de refrigeração, procedendo à análise o mais atempadamente possível, com as garrafas a serem abertas apenas no momento da sua utilização [59,60].

3.2 Métodos de extração e pré-concentração de amostras

A preparação da amostra para determinação das substâncias de interesse assume importância por motivos de complexidade da matriz e interferência produzida por componentes desta, ou por os compostos existirem em concentrações vestigiais e ser necessária a pré-concentração do analito [13,61]. Considerados estes aspetos, a técnica preparativa a eleger visa a compatibilidade da amostra processada com o ensaio a executar, de modo eficiente e consistente, idealmente com simplicidade e reduzida manipulação e produção de resíduos.

3.2.1 Compostos organofosforados

As estratégias para extração de pesticidas orgânicos vão desde a clássica extração líquido-líquido até técnicas modernas de processamento de matrizes, como a extração

em fase sólida (SPE), a micro-extração em fase sólida (SPME), ou a SPE dispersiva [13,62–64]. Encontram-se seguidamente descritas de forma breve as estratégias referidas para a extração e concentração de compostos organofosforados, com foco nas particularidades de cada técnica relativamente ao tipo de amostras a processar e suas vantagens.

3.2.1.1 Extração líquido-líquido

O fundamento da extração líquido-líquido (LLE) consiste na partição de uma espécie entre duas fases líquidas imiscíveis, uma orgânica e outra aquosa, em que a distribuição das substâncias de interesse pelas duas fases dependerá da maior afinidade dos solutos para o solvente extrator, volumes utilizados e número de extrações. O coeficiente de partição traduz uma medida da afinidade do analito para o solvente extrator, podendo esta ser afetada por variação do pH e alteração no equilíbrio das espécies em solução. A extração de compostos organofosforados pode ser realizada com solventes como o hexano, o éter dietílico ou o diclorometano [65]. No entanto, as dificuldades de automação e os grandes volumes de resíduos de solventes produzidos comparativamente a técnicas modernas limitam o seu uso.

3.2.1.2 Extração em fase sólida (SPE)

A técnica de SPE encontra-se entre as mais desenvolvidas e estudadas para a preparação de amostras, consistindo o seu fundamento na partição do analito entre duas fases, uma estacionária e a matriz da amostra líquida [13,66,67]. As substâncias de interesse devem apresentar maior afinidade para a fase estacionária, comparativamente à solução em que estão veiculadas, determinando que o composto alvo seja eficazmente retido e possa ser removido do cartucho numa etapa seguinte de eluição, por recurso a solvente adequado. Os eluatos obtidos por este processo são frequentemente evaporados à secra sob uma corrente de gás inerte e aquecimento controlado, e retomado o resíduo num pequeno volume de solvente orgânico compatível com a metodologia de análise a executar [66].

A interação dos analitos com a fase estacionária pode ser de natureza hidrofóbica – *Van der Waals* – no caso de fases estacionárias apolares, por pontes de hidrogénio na SPE de

fase normal, ou eletrostáticas no caso da troca iônica. A considerar que a especificidade das interações será um fator a ter em conta na escolha do enchimento dos cartuchos, constituindo uma vantagem da SPE a diversidade e versatilidade das fases estacionárias existentes [66]. De entre as matrizes sólidas indicadas para a extração de compostos organofosforados, as fases poliméricas (cartuchos comerciais como *Elut*® PPL, *Sigma Aldrich*® LC-CN ou *Oasis*® HLB) são as que apresentam maior versatilidade e abrangência para a retenção desta classe de compostos [13,55,66].

Para a execução deste trabalho experimental foram escolhidos cartuchos *Oasis*®HLB, por estarem referenciadas retenções eficientes e recuperações elevadas para os compostos organofosforados, permitindo a obtenção de extratos isentos de interferentes importantes e a compatibilidade dos concentrados com a análise por LC-MS/MS [55,56].

A estrutura polimérica da matriz *Oasis*®HLB apresentada na Figura 10 é caracterizada por um balanço hidrofílico-lipofílico, ao conter anéis aromáticos, grupos polares carbonilo e heteroátomos de azoto, os quais determinam a versatilidade na captação e retenção dos pesticidas a extrair [55,68]:

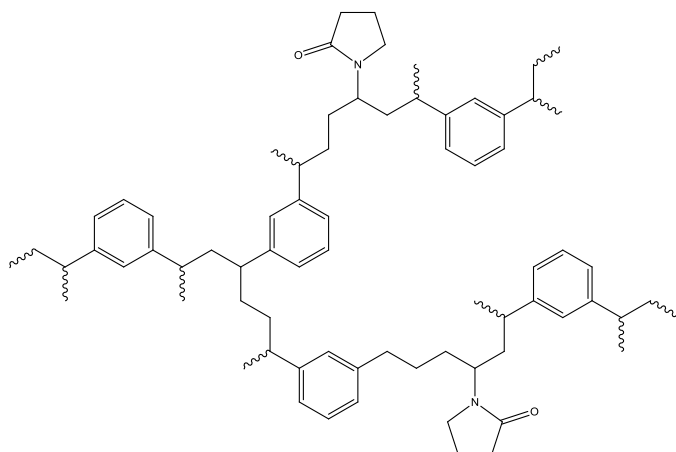


Figura 10 – Estrutura polimérica da fase estacionária *Oasis*®HLB.

Etapas da extração por SPE

O procedimento geral para extração em fase sólida envolve a sequência de etapas descrita na Figura 11:

Condicionamento (A): realizado pela passagem sequencial de pequenos volumes de solventes, selecionados de acordo com a fase estacionária e a natureza matricial da

amostra a extrair. Este processo prepara a fase estacionária para interação com a amostra e seus componentes, com vista a promover a reprodutibilidade das condições de retenção dos analitos [66,69]. No caso de amostras aquosas para a extração de pesticidas, a fase estacionária é condicionada com pequenos volumes de solvente orgânico, seguido da passagem de água purificada [55].

Retenção do analito (B): a passagem da amostra através da fase estacionária resulta na retenção dos compostos presentes para os quais exista afinidade, nomeadamente as substâncias de interesse e eventuais interferentes ou componentes da matriz [66,69].

Lavagem (C): após passagem do volume especificado de amostra, um volume de solvente da mesma natureza é carregado através do cartucho com o objetivo de arrastar substâncias da matriz fracamente adsorvidas à fase estacionária [66,69].

Secagem: etapa suplementar para eliminar o solvente que “molha” a fase estacionária, particularmente importante quando o eluente a utilizar na etapa seguinte não é miscível com o solvente da amostra. Na extração de amostras aquosas e posterior eluição com solvente orgânico miscível, como o metanol, a secagem não é fundamental, mas promove o contato eficaz entre o eluente e as moléculas adsorvidas à superfície da fase estacionária [66,69].

Eluição (D): o cartucho é atravessado por um solvente para o qual os compostos apresentam afinidade, tendo a capacidade de captar e solubilizar os analitos adsorvidos à fase sólida, com as moléculas de interesse a serem recolhidas no eluato [66,69].

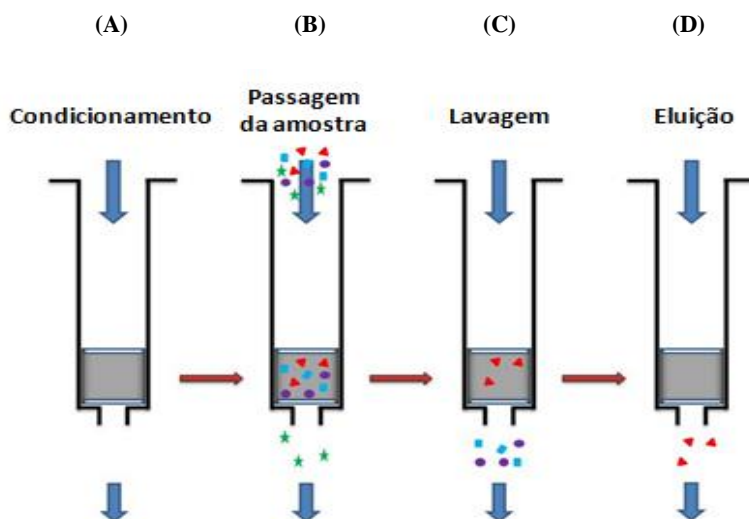


Figura 11 – Procedimento normal de Extração em Fase Sólida (SPE).

Nota adicional: quando o objetivo é reter compostos interferentes, uma vez realizado o condicionamento a aplicação da amostra e a eluição ocorrem em simultâneo.

O extrato obtido é seguidamente evaporado à secura e retomado em volume rigorosamente medido de solvente, concentrando o analito numa alíquota muito inferior ao volume inicial de amostra a ser extraída, e contribuindo para os baixos limites de deteção e quantificação a atingir. As virtudes deste método incluem ainda a elevada reprodutibilidade comparativamente a outras técnicas, a ser avaliada pela precisão atingida em ensaios de recuperação [55,61].

Em resumo, a técnica de SPE exige reduzida manipulação, decorrendo sem que haja a formação de emulsões como em técnicas clássicas de extração líquido-líquido, e possibilita a obtenção de extratos limpos com elevada reprodutibilidade. No âmbito da análise de pesticidas em águas destinadas ao consumo humano, a técnica de SPE permite obter uma fração da amostra inicial, contendo os compostos de interesse e a sua concentração num volume reduzido de solvente, de modo a que a análise possa ser realizada na ausência de interferentes significativos e detetados os níveis vestigiais dos compostos [55,68].

A extração em fase sólida (SPE) pode ser operada acoplada diretamente ao sistema cromatográfico (modo *on-line*), quando exista compatibilidade do eluato resultante da extração com a fase móvel a utilizar na análise cromatográfica, ou opcionalmente realizada em modo *off-line* em que o extrato é processado e concentrado previamente à análise instrumental [55,70].

3.2.1.3 SPE dispersiva

A técnica de SPE dispersiva consiste na combinação de uma etapa prévia de extração líquido-líquido com a extração em fase sólida propriamente dita, estando particularmente indicada para amostras ambientais, alimentares ou forenses que possuam particulados em suspensão ou elevada complexidade. O desenvolvimento desta técnica foi empreendido por *Anastassiades et al* e designada pelo acrónimo QuEChERS, correspondente a *Quick, Easy, Cheap, Effective, Robust and Safe* [71]. Estão seguidamente especificadas (Figura 12) as etapas que descrevem a técnica e procedimentos que maximizam a sua eficiência:

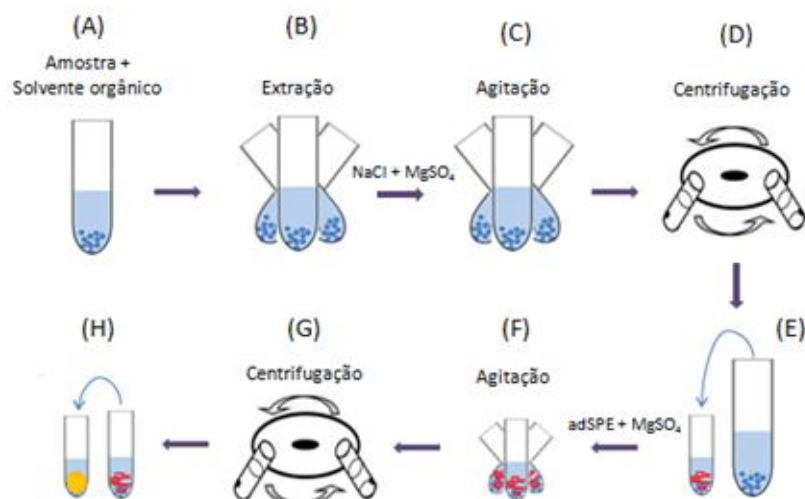


Figura 12 – Esquema representativo de SPE dispersiva.

A amostra é adicionada de um volume de solvente orgânico (A) para que ocorra a partição líquido-líquido por agitação (B). A etapa (C) corresponde à adição de $\text{NaCl} + \text{MgSO}_4$ e agitação, seguida de centrifugação (D) e transferência de uma alíquota de sobrenadante para um vial com um adsorvente de SPE + MgSO_4 (E). A adição de NaCl tem o objetivo de provocar o “*salting out*” por diminuição da solubilidade dos compostos na fase aquosa, e deste modo promover a passagem de solutos para a fase orgânica. O MgSO_4 atua como um agente secante, por reter água e aumentar a concentração dos compostos na fase aquosa, o que pela dinâmica de partilha favorece a sua passagem para a fase orgânica. A reação de hidratação do MgSO_4 é exotérmica, sendo a partição dos solutos para a fase orgânica promovida pelo aumento de temperatura. As etapas de agitação e centrifugação (F) e (G) removem as microgotículas de água remanescentes e os interferentes são retidos pelo adsorvente sólido, terminando o processo com a transferência do extrato (sobrenadante) para *vial* e acondicionamento até análise (H). A etapa de limpeza com adsorvente de SPE é fundamental para eliminar interferentes e obter consistência de resultados [71].

A SPE dispersiva tem encontrado utilidade na extração de compostos a partir de matrizes complexas, por adaptações orientadas no sentido de obter extratos limpos e concentrados. O recurso a esta técnica tem recaído essencialmente na extração de resíduos de pesticidas presentes em amostras alimentares, como frutos e vegetais, carne e gordura animal ou mel. Os aditivos mais poderosos e utilizados para “remover” os ácidos orgânicos, açúcares ou ácidos gordos da matriz, são as aminas do tipo primário-

secundário (PSA). Este adsorvente corresponde a uma cadeia linear orgânica com grupos amina mono e di-substituídos, ligada a um átomo de silício [72]. Os agentes como o citrato são usados para a estabilização de moléculas lábeis de pesticida, ou o recurso ao adsorvente apolar C18 para reter gorduras interferentes [73–75].

O procedimento de SPE dispersiva exige maior manipulação que as técnicas de SPE ou SPME, mas apresenta versatilidade para a extração simultânea de compostos quimicamente distintos, particularmente em amostras de matriz complexa, com eliminação de interferentes e obtenção de recuperações elevadas. A principal desvantagem apresentada é o menor fator de concentração atingido, quando comparada a técnicas disseminadas e estabelecidas como a SPE, pelo que pode necessitar de maior quantidade de amostra para atingir níveis de quantificação equiparáveis [73]. Em conclusão, a SPE dispersiva assume elevado valor na extração e limpeza de amostras de matriz complexa, sem no entanto se apresentar compatível com o elevado volume a extrair e concentrar para se atingirem os limiares analíticos desejados, quando se analisam águas destinadas ao consumo humano.

3.2.1.4 Micro-extração em fase sólida (SPME)

A técnica de SPME é considerada uma prática da designada Química Verde, por não utilizar solventes orgânicos para a retenção dos analitos e reduzir em larga extensão a produção de resíduos, apresentando como vantagens funcionais a possibilidade de automação e redução do tempo de ensaio [69,76]. O procedimento desenvolvido por *Arthur e Pawliszyn* utiliza uma fibra recoberta por um filme fino de material polimérico, comumente poli(dimetilsiloxano) ou poliacrilato, ou adsorventes sólidos como carvão ativado. O filamento encontra-se integrado num sistema de seringa, e a adsorção de analito ocorre por contato direto da fibra com a amostra (SPME direto) ou por exposição em sistema fechado a uma fase gasosa em equilíbrio com a amostra líquida ou sólida (*Head-space*-SPME), representado na Figura 13 [69,76].

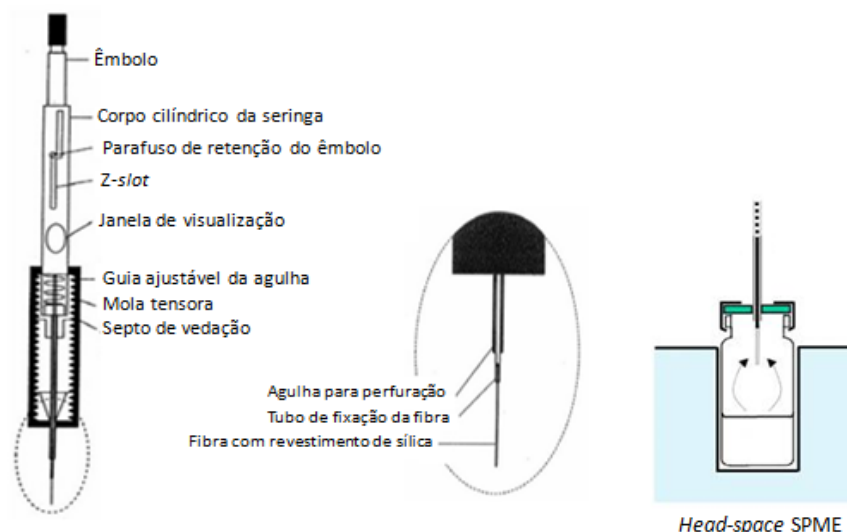


Figura 13 – Composição de dispositivo de SPME e esquema de HS-SPME.

A reprodutibilidade da extração por SPME depende de um rigoroso controlo do tempo, das condições de pH, velocidade de agitação, força iónica da solução e temperatura, que condicionam a partição do soluto e a sua volatilidade [69].

A dessorção dos compostos pode ser realizada por introdução direta da fibra no injetor em cromatografia gasosa, enquanto no caso de cromatografia líquida a solubilização dos compostos adsorvidos à fibra requer a partição com solventes orgânicos, podendo esta constituir mais uma etapa problemática em termos de reprodutibilidade da extração. As metas do desenvolvimento tecnológico visam deste modo o acoplamento de uma *interface* entre a fibra de SPME e a instrumentação de LC [69,77].

3.2.2 Acrilamida

3.2.2.1 Extração em fase sólida com cartuchos de carvão ativado

A acrilamida é uma molécula orgânica de pequena dimensão com elevada polaridade e hidrofilia, o que dificulta e condiciona a aplicabilidade das técnicas de extração, quando se analisam matrizes aquosas mais ou menos complexas [51].

O recurso a diversas fases estacionárias de SPE tem encontrado utilidade na extração de acrilamida e limpeza de amostras preparadas a partir de produtos alimentares [78,79]. Nestes métodos, o volume de extrato aplicado ao cartucho de SPE é de apenas alguns mililitros, e a acrilamida pode ser efetivamente retida pela fase estacionária. No caso de

análises ambientais, a elevada solubilidade da acrilamida em água determina que esta seja simultaneamente eluída quando se aplicam volume relativamente grandes de amostra. O ensaio de uma diversidade de fases estacionárias demonstrou a ocorrência de um volume de *breakthrough* pequeno para a maioria dos cartuchos experimentados, comprovando a incapacidade destes em extrair significativamente o analito [78]. Uma vez que as amostras ambientais aquosas apresentam níveis residuais de acrilamida, a escolha do material adsorvente adquire importância fundamental para o sucesso da etapa de pré-concentração, essencial para serem atingidos os limites de deteção e quantificação ambicionados [78,80]. O uso de carvão ativado como fase estacionária está referenciado para GC-MS e LC-MS, demonstrada a eficácia em reter a AA para grandes volumes de solução (> 250mL), sem que a passagem da própria amostra comprometa a extração do analito [51,78,81].

Um sistema elaborado de montagem em série de um cartucho C18 e três cartuchos não comerciais de carvão ativado foi proposto por *Kawata* para conseguir a retenção da acrilamida e a sua concentração no extrato, permitindo obter limites de quantificação na ordem de 0,02µg/L. A aplicabilidade deste método faz prever a morosidade de execução e a necessidade de desenvolver uma fase estacionária de carvão ativado padronizada, para consistência e universalidade dos resultados analíticos [81].

As referências mais recentes acerca da preparação de amostras para a determinação de acrilamida por LC-MS/MS propõem cartuchos comerciais de SPE com carvão ativado (6mL, 500mg) como fase estacionária para retenção eficaz de acrilamida, com posterior eluição, evaporação e mudança de solvente [51]. Esta metodologia compreende a passagem de um volume típico de 500mL de amostra através do cartucho de SPE, a um dado fluxo, após condicionamento com determinados volumes de metanol e água desmineralizada. Os frascos contentores de padrão ou amostra fortificada devem ser enxaguados com água, e este volume seguidamente carregado através do cartucho. A técnica procede com a lavagem do cartucho com água desmineralizada e secagem sob uma corrente de N₂, sendo utilizado metanol como eluente. O extrato é seguidamente evaporado à secura, e o resíduo retomado em volume rigorosamente medido do mesmo solvente (metanol) e transferido para *vials* a utilizar no amostrador do cromatógrafo [51].

3.2.2.2 Co-evaporação de acrilamida e água

A elevada solubilidade da acrilamida em água constitui a principal barreira na aplicação de técnicas de extração múltipla líquido-líquido ou extração em fase sólida para o enriquecimento em analito. Estes procedimentos estão comumente indicados como etapas de limpeza (*clean-up*) para remover interferentes em amostras alimentares, por estes serem extraídos para a fase orgânica ou retidos no cartucho de SPE, permanecendo a acrilamida na fase aquosa. Com base nesta condição, existe proposto um método preparativo de co-evaporação de acrilamida e água, o qual possibilita em simultâneo concentrar o analito e remover potenciais interferentes presentes na amostra [82].

O método descrito propõe a realização dos ensaios com o volume de 50mL de amostra aquosa, transferidos para um balão de destilação e adicionados de uma solução 10% (v/v) de hidróxido de amónio, para ajustar o pH a próximo de 10. Seguidamente, a amostra é fortificada com padrão interno de acrilamida deuterada, e realizada a evaporação à secura em sistema rotativo, operado sob vácuo a temperatura de 90°C. O resíduo existente no balão é dissolvido numa alíquota de água desmineralizada e procede-se a uma nova destilação, repetindo esta etapa 3 vezes com vista a maximizar o rendimento do processo. O condensado é transferido para um balão de destilação e acidificado a pH=3 com ácido fórmico, sendo este concentrado até um volume de cerca de 2mL por evaporação [82].

Após arrefecimento, o conteúdo do balão é transferido para um tubo de centrífuga com lavagem por metanol, sendo esta solução submetida a evaporação à secura e o resíduo reconstituído em pequeno volume rigorosamente medido de metanol, para subsequente compatibilidade e análise por LC-MS/MS [82].

As referências indicam que, apesar de ocorrerem extensas perdas da acrilamida no processo de destilação, existe significativa co-evaporação de AA e água em soluções básicas, quando comparada com a evaporação simultânea em condições ácidas. Os resultados experimentais publicados indicam a permanência de cerca de 70% da acrilamida no balão para pH=3 quando se procede a evaporação à secura, enquanto 50% da quantidade inicial pode ser condensada no destilado para soluções iniciais básicas. Deste modo, a acidificação do condensado antes da etapa final de evaporação maximiza a recuperação do analito. Apesar de não ser possível a co-evaporação de toda a acrilamida, uma percentagem significativa poderá ser retomada e concentrada em

solvente compatível com a instrumentação de LC [82]. Neste contexto, a precisão e recuperação do processo descrito assumem importância fundamental para a validação e aplicabilidade do método, por ser necessário comprovar a reprodutibilidade e consistência dos resultados. A concentração da acrilamida em volume reduzido permitiria a quantificação dentro dos limites regulamentados pelas diretivas Europeias.

O processamento por destilação permite eliminar potenciais interferentes existentes na amostra, o que pode representar uma vantagem se este método for aplicado a matrizes complexas, distintas das águas de consumo. Ainda a nível extraordinário, as características de hidrofília da acrilamida permitem que em amostras ambientais com sólidos ou partículas em suspensão se possa proceder a uma filtração por seringa ou papel microporoso, sem perda de acrilamida na amostra. Um importante aspeto a atentar na preparação de soluções *stock* é a proposta da inclusão de hidroquinona na concentração de 0,1mg/mL para prevenir a polimerização da AA [82].

Alternativamente, de modo simplificado e direcionado para amostras de matriz pouco complexa como as águas de consumo, poderá ser experimentada a evaporação direta de uma amostra acidificada e a sua reconstituição em volume reduzido de metanol ou outro solvente orgânico adequado. Este procedimento constitui uma potencial abordagem a investigar no decurso do presente trabalho experimental. Como nota adicional, o processamento de amostras por esta técnica requer a avaliação da estabilidade térmica do composto, a qual deve ser verificada por comparação das concentrações encontradas para amostras brancas de matriz fortificada, antes e depois do tratamento térmico [82].

4 Fundamentos analíticos abordados

4.1 Pesticidas

A metodologia a implementar neste trabalho tem por base a descrita no *United States Geological Survey* para a monitorização multiresíduo de pesticidas, adaptada no sentido de enquadrar um procedimento laboratorial multi-análito de análise dos pesticidas em águas destinadas ao consumo humano [56].

Os métodos analíticos comumente utilizados para a determinação de pesticidas organofosforados consistem em cromatografia gasosa com deteção por captura eletrónica (ECD) ou espectrometria de massa (MS), ou cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa *tandem*. Ambas as técnicas estão indicadas, orientando o sistema de GC-MS para compostos voláteis de natureza química diversa, e o sistema de LC-MS/MS para pesticidas com maior polaridade e/ou termolábeis [83–85]. As gerações de pesticidas utilizados modernamente correspondem a moléculas de média a elevada polaridade e relativamente estáveis termicamente, determinando a cromatografia líquida como técnica de eleição para a separação e análise destes compostos.

A análise por cromatografia líquida tem o objetivo de separar os compostos ao longo da coluna cromatográfica, eluídos sequencialmente de acordo com um programa definido de caudal, temperatura da coluna (termostatizado), e eluição em modo isocrático ou de gradiente com as fases móveis específicas. A otimização e reprodução destas condições serão de fundamental importância para o desempenho do método e interpretação dos resultados experimentais. O recurso a cromatografia líquida de ultra *performance* (UPLC) traduz um refinamento recente da cromatografia líquida, em que são utilizadas fases estacionárias com diâmetro de partícula muito reduzido (cerca de 2 µm) e operadas elevadas pressões de fase móvel (na ordem dos 13000 psi), permitindo uma muito mais elevada eficiência separativa, assim como maior sensibilidade para as variações de massa no detetor [55,86]. A notar que as definições da separação cromatográfica a utilizar são baseadas no método desenvolvido internamente para a determinação desta classe de compostos, através da análise de padrões individuais e otimização das condições cromatográficas e de deteção de massas.

4.2 Acrilamida

As técnicas instrumentais de análise convencionalmente utilizadas para a detecção e quantificação de acrilamida (AA) envolvem a separação cromatográfica, seguida da detecção por espectrofotometria ou espectrometria de massa [87]. Existem métodos analíticos desenvolvidos para a análise de acrilamida, sendo que nem todos podem ser adaptados para a quantificação em águas de consumo, uma vez enquadrados os limiares analíticos dentro de uma gama de trabalho que compreenda os valores recomendados pelas diretivas Europeias [45,51,80,82,88].

Cromatografia gasosa (GC)

No âmbito analítico estão mais extensamente desenvolvidos procedimentos para a determinação de acrilamida em alimentos, principalmente baseados em cromatografia gasosa e detecção por captura eletrónica ou espectrometria de massa [47,81,89]. As técnicas instrumentais de GC-ECD e GC-MS requerem o aumento da volatilidade por derivatização prévia da molécula, apresentando o processo eficiência variável e morosidade de execução considerável [89].

A acrilamida pode ser derivatizada por bromação formando 2,3-dibromopropionamida, a qual é posteriormente analisada por GC com detecção por captura eletrónica (ECD) ou espectrometria de massa (MS) [89,90]. Em alternativa, pode ser utilizado um detetor de ionização por chama (FID), constituindo no entanto perda de sensibilidade [60,89].

Cromatografia líquida (LC)

A separação e detecção por LC-MS não exigem a derivatização, pelo que pode simplificar e tornar mais expedita a análise [51,60].

A separação efetiva de acrilamida por cromatografia líquida e determinação da sua concentração por espectrofotometria de UV constitui um método rápido e sensível, mas que apresenta limite de detecção inadequadamente elevado para o exigido pela legislação que regulamenta a qualidade da água destinada ao consumo [45,51,59,82,91]. O método EPA 8316 descreve o recurso a cromatografia líquida de alta *performance* acoplada a detecção por absorção no UV (195nm) para monitorizar as concentrações de AA em

águas. No entanto, a coluna de fase reversa C18 especificada no método não retém a AA, devido às características de polaridade/solubilidade da molécula, além de que o limite de detecção de 10µg/L se apresenta demasiado elevado para fins de regulamentação [59]. Em analogia, *Weideborg* determinou acrilamida em amostras ambientais por LC com injeção direta numa coluna de fase reversa com detecção por UV, tendo atingido um limite de detecção de 5µg/L [45,51,92].

As características da coluna adquirem relevância quando considerada a afinidade do analito para a fase estacionária, assim como as especificações de composição da fase móvel, modo de eluição, caudal e temperatura do sistema a operar.

Na separação por cromatografia líquida, a comumente utilizada fase estacionária apolar C18 não se apresenta como a mais adequada para a análise da acrilamida, devido à polaridade e elevada hidrofília da molécula fazer prever um tempo de retenção muito curto. No entanto, como as colunas C18 são das mais usadas em laboratórios de análise, os estudos referenciados avaliaram o comportamento cromatográfico da acrilamida nesta fase estacionária, procurando demonstrar que a sua aplicação em análises rápidas está dependente de os interferentes da matriz serem removidos, ou a amostra ser bastante “limpa” [82]. Em colunas de fase reversa, o estudo realizado por *Shaogang* e *Metcalfe* descreve a água pura ou soluções aquosas a 0,01% de ácido fórmico ou ácido acético como fases móveis comuns para a análise de acrilamida, referindo que a presença de ácido aumenta a intensidade de sinal em MS mas compromete a resolução cromatográfica [82]. A investigação reporta ainda que a adição de metanol ou acetonitrilo à fase móvel aquosa provocaram um decréscimo na resposta, sem observar melhoria na resolução dos cromatogramas. Deste modo, a água pura com qualidade para cromatografia foi utilizada como fase móvel para um estudo realizado com este tipo de coluna [82].

A introdução de colunas de troca iónica com elevada capacidade, que utilizam fases estacionárias de tamanho de partícula na microescala, têm encontrado aplicação na análise por LC-MS de amostras alimentares, estando na origem do desenvolvimento de métodos por injeção direta de grande volume para a determinação de acrilamida em água. A utilização de maiores volumes de amostra tem como objetivo serem atingidos menores limiares analíticos para a técnica. O recurso a este tipo de colunas evidencia vantagens na separação de acrilamida, por explorar os múltiplos mecanismos de

retenção da fase estacionária. A seletividade de separação encontra-se complementada pela elevada capacidade da coluna, permitindo a injeção de grandes volumes (500µL) e contornando as limitações de sensibilidade [45,93].

O sistema de cromatografia líquida de troca iônica com detecção por MS descrito por *Cavalli et al* permitiu a quantificação de AA para concentrações não inferiores a 0,50µg/L, com repetibilidade aceitável e sem que fosse necessário qualquer pré-tratamento das amostras. Apesar de permitir analisar níveis vestigiais de AA, o limite de detecção estimado como 0,20µg/L não se apresenta suficientemente baixo para corresponder às especificações da diretiva Europeia para água destinadas ao consumo. A metodologia proposta não descarta no entanto a possibilidade de poderem ser atingidos limiares analíticos inferiores e maior sensibilidade, por recurso a um sistema de detecção por espectrometria de massa *tandem* [45,79,93,94].

A investigação empreendida por colaboradores da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (EPA) refere a otimização de um sistema de cromatografia líquida para a análise de amostras processadas por SPE com cartuchos de carvão ativado, descrevendo as condições de operação para uma fase estacionária de troca iônica Dionex®IonPacICEAS1 acoplada a pré-coluna (preservar a integridade funcional da coluna). Este sistema foi operado em modo isocrático, com a fase móvel a ser constituída por uma mistura 50:50 de ácido fórmico 0,1% em água e ácido fórmico 0,1% em acetonitrilo, para um volume de injeção, caudal e temperatura da coluna definidos. A investigação reportada indica que com esta coluna foi possível reter e analisar a acrilamida de modo reprodutível, sob as condições de operação especificadas [51]. O método descrito constitui a base para a definição das condições e parâmetros instrumentais a utilizar no âmbito deste trabalho experimental. O laboratório do Cesab não dispõe de uma coluna de troca iônica semelhante à descrita na literatura, pelo que o trabalho experimental é realizado com recurso a uma coluna *Acquity® HSS T3*, indicada para a retenção de compostos polares e concebida para operar com fases móveis aquosas [95]. As especificações a definir compreendem a composição da fase móvel, a temperatura do sistema e o caudal a operar, estando o volume de injeção limitado ao volume do *loop* existente.

5 Objetivos do trabalho experimental

As diretivas Europeias e a legislação nacional regulamentam os níveis residuais dos compostos a serem controlados em águas destinadas ao consumo humano [3]. As atividades de controlo e promoção dos parâmetros de qualidade da água requerem como instrumento a disponibilidade de metodologias analíticas válidas, sensíveis e robustas, adequadas para a determinação dos baixos níveis de concentração a existir, e assegurar o cumprimento das especificações constantes na lei. No sentido de satisfazer este requisito, existe a necessidade de serem utilizadas técnicas de processamento das amostras, as quais permitam o ensaio de alíquotas com concentrações detetáveis e quantificáveis das substâncias, sem que a presença de interferentes de matriz dificulte ou impossibilite a sua determinação reprodutível. Neste trabalho foram abordadas técnicas preparativas para a extração, limpeza e pré-concentração de amostras, com vista a eleger o método de processamento para a extração dos compostos a serem determinados em águas destinadas ao consumo humano. A escolha da SPE tem por base a matriz relativamente simples de águas destinadas ao consumo e a adequação ao propósito, tomando ainda em consideração as vantagens da técnica e o custo da sua aplicação em rotina.

O trabalho experimental a realizar incidirá sobre a validação e implementação de metodologias para a determinação de ometoato e acrilamida em águas, através da retenção e pré-concentração por extração em fase sólida (SPE), com subsequente análise por cromatografia líquida de ultra *performance* e deteção por espectrometria de massa *tandem* (LC-ESI-MS/MS). Os objetivos compreendem a validação e integração do método analítico para o ometoato no procedimento de rotina para a análise multiresíduo de pesticidas em amostras de água, e o desenvolvimento e validação de uma técnica para a determinação de níveis vestigiais de acrilamida em águas de consumo humano. A pré-concentração dos analitos por SPE e o acoplamento de UPLC a espectrometria de massa *tandem* apresentam o potencial de conferir elevada seletividade e sensibilidade para o método, por se basearem na separação do composto e monitorização de fragmentos específicos gerados em MS/MS. Os requisitos legais de desempenho de métodos analíticos deverão ser ainda avaliados e verificado o seu cumprimento de acordo com a legislação publicada em Diário da República [3].

6 Método analítico

6.1 Cromatografia líquida e espectrometria de massa

O acoplamento de espectrometria de massa *tandem* à cromatografia líquida originou uma das metodologias analíticas com maior seletividade, indicada para a identificação de compostos em matrizes de natureza e complexidade diversas, ou nos respetivos extratos. A técnica de LC-MS/MS produz informação a nível bidimensional, por considerar o tempo de retenção do composto e registar a informação espectral do eluído a dado momento [13,55,86].

A elevada sensibilidade da metodologia de LC-MS/MS constitui um aspeto fundamental para a quantificação das quantidades vestigiais dos compostos a serem pesquisados em águas destinadas ao consumo humano [69,86].

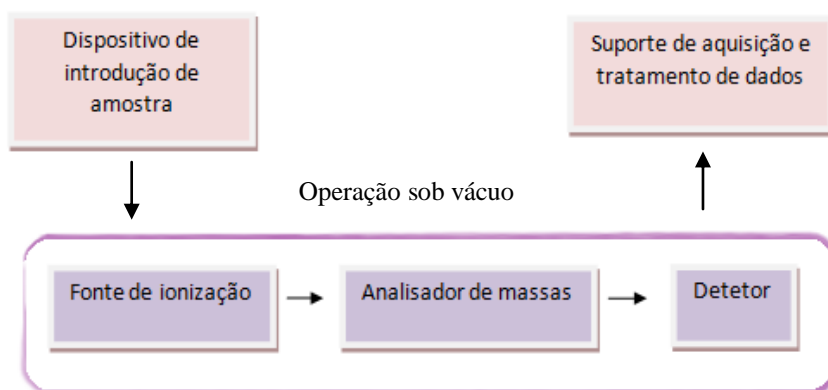


Figura 14 - Esquema representativo de operação de um espectrómetro de massa.

O diagrama da Figura 14 representa os componentes e operação de um espectrómetro de massa. O dispositivo de introdução da amostra transfere o composto eluído da coluna cromatográfica para a fonte de ionização, sendo os iões gerados conduzidos para o analisador de massas que vai proceder à separação dos iões em função da razão massa/carga. Os iões analisados seguem para o detetor e o sistema de aquisição de dados regista o espectro de massa [96].

De entre a disponibilidade de fontes de ionização, o recurso ao *electrospray* (ESI) apresenta-se como um modo fiável, robusto e sensível para a ionização dos pesticidas organofosforados e da acrilamida, constituindo a interface entre a separação

cromatográfica e a análise por MS/MS [13,86]. A ESI constitui uma técnica de ionização suave, em que as condições de voltagem aplicadas determinam a reduzida ou inexistente fragmentação do ião molecular, correspondente a $[M+H]^+$ quando se opera em modo ESI positivo, ou $[M-H]^-$ para o modo ESI negativo.

A otimização do fluxo de gás N_2 e a voltagem aplicada ao cone constituem fatores influentes para a formação da pluma e eficiência da ionização na fonte, resultando na geração do ião molecular $[M+H]^+$ e/ou adutos da molécula com iões presentes na fase móvel [69]. Na Figura 15 está representado o funcionamento de uma fonte de ESI, em que a dessolvatação dos iões ocorre por dispersão da pluma/nuvem em gotículas progressivamente mais pequenas, até obter os iões em fase gasosa.

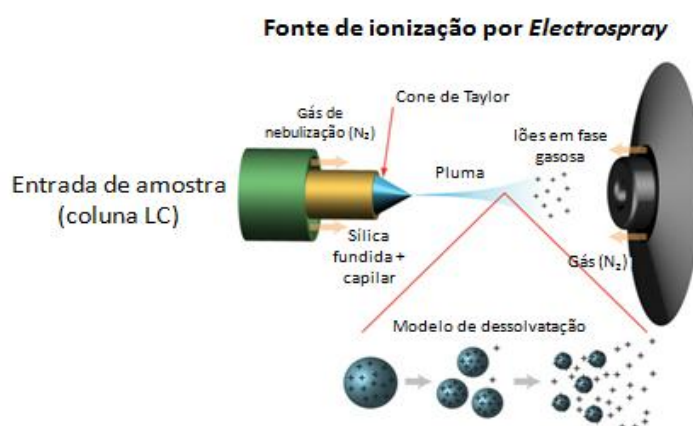


Figura 15 – Fonte de ionização por ESI.

Os iões produzidos na fonte de ionização são conduzidos para o analisador de massas, onde ocorre a sua separação em função do valor da razão massa/carga. O analisador mais comum e economicamente acessível, mas com menor poder de resolução para a discriminação de massas muito próximas é o quadrupolo, o qual é constituído por quatro barras cilíndricas dispostas com a mesma orientação, e em que a cada duas barras posicionadas diametralmente é aplicada uma corrente contínua e uma corrente alterna de radiofrequência (Rf), respetivamente (Figura 16). O varrimento de Rf vai determinar que os iões descrevam uma trajetória produtiva no interior do quadrupolo, induzida pelo campo magnético em função do valor de m/z , resultando na ejeção diferencial dos iões para o detetor [69].

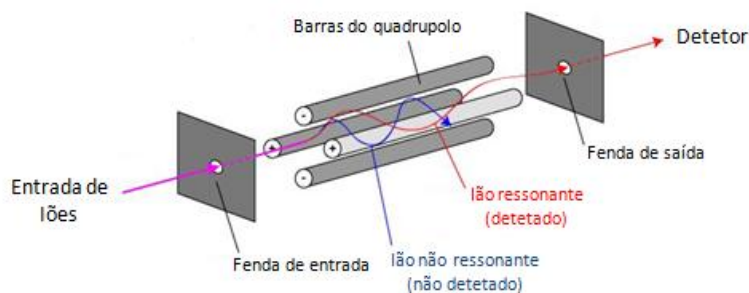


Figura 16 – Operação de um Analisador Quadrupolar.

Na execução de MS/MS para monitorização de íons fragmento característicos, o analisador a utilizar vai ser um triplo quadrupolo (TQ), em que são acoplados em série três quadrupolos para o estudo do íon molecular e dos produtos resultantes da sua fragmentação [96].

A informação encontrada no espectro de massa pode ser adquirida segundo quatro modos de aquisição: modo de varrimento ou SCAN, modo seletivo de íons ou SIM, MS/MS em modo DS (*Daughter Scan*), e MS/MS para monitorização de transições de massa específicas MRM [13,55,83].

O ensaio de soluções individuais preparadas em fase móvel adquire importância para proceder ao estudo e especificação das condições ótimas de operação do espectrómetro de massa, nomeadamente a voltagem do cone e as energias de colisão em MS/MS para cada um dos determinandos em estudo. A caracterização dos parâmetros nos quais se baseia a identificação do composto alvo constitui um aspeto fundamental para a seletividade da técnica analítica. A monitorização de fragmentos específicos possibilita contornar os problemas de resolução relativos ao processo cromatográfico, constituindo uma das grandes vantagens do método por LC-MS/MS [13,55,61].

As fases móveis utilizadas em cromatografia líquida podem ter na sua constituição sais inorgânicos, adquirindo estes importância na ionização por *electrospray*, pelo que deve ser considerada a possível formação de adutos com o solvente ou íons comumente presentes, dando origem a íons $[M+NH_4]^+$, $[M+Na]^+$ ou $[M+K]^+$. A maior prevalência destes íons pode impedir ou dificultar a monitorização do íon $[M+H]^+$, precipitando o analista em interpretações incorretas acerca da presença do íon no espectro de massa [13,55,69,86]. O tamponamento das fases móveis em cromatografia líquida adquire importância particular no controlo das características de polaridade e ionização dos

compostos, as quais afetam determinante o tempo de retenção e o *tailing* ou arrastamento dos picos no cromatograma [96,97]. Os sais comumente utilizados devem apresentar pureza para análise em cromatografia, miscibilidade no solvente da fase móvel e não serem reativos com os analitos [97]. Existe uma diversidade de tampões, mas os mais utilizados correspondem a sais inorgânicos na grande maioria não voláteis. Uma das funções da interface por *electrospray* é a dispersão do eluído e a dessolvatação dos iões, resultando na deposição de moléculas de tampão na fonte de ionização, com a consequente afetação do desempenho do detetor. Deste modo, assume preferência o recurso a um tampão volátil como o acetato de amónio para a preparação das fases móveis na análise de pesticidas por LC-MS [96].

No modo SCAN de aquisição é escolhido um intervalo de razão massa/carga, dentro do qual o analisador vai realizar varrimentos sucessivos de massas, e a soma das intensidades obtidas corresponde ao cromatograma de corrente iónica total (TIC – *Total Ion Current*). A obtenção dos espectros de massa em modo SCAN tem como objetivo a identificação do pico cromatográfico correspondente ao composto de interesse e inferir acerca da razão m/z do ião molecular esperado, para que a análise possa então ser realizada no modo seletivo de iões (SIM – *Selected Ion Monitoring*). A aquisição de dados no modo SIM consiste na monitorização exclusiva das massas selecionadas pelo analisador quadrupolar, sendo que a acumulação de leituras permite a obtenção de sinais intensos e a deteção de substâncias presentes em concentrações muito baixas (ordem de 10^{-14} g.seg $^{-1}$). Esta opção adquire particular importância em análise quantitativa, requerendo o conhecimento dos iões a selecionar por análise prévia em modo SCAN [55,61,69]. Nestas duas etapas procede-se ao afinamento da voltagem do cone, com o objetivo de determinar o valor de voltagem que produz o sinal mais intenso para a razão m/z correspondente ao ião molecular-composto alvo (Figura 17).

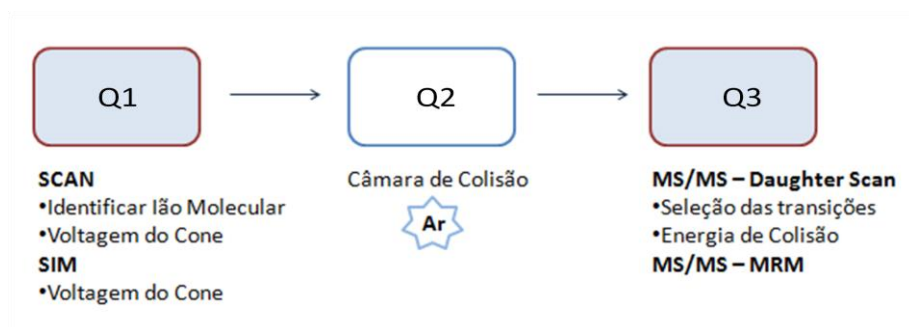


Figura 17 – Diagrama de procedimento de otimização das condições de MS/MS.

Em espectrometria de massa *tandem* a operação do primeiro quadrupolo em modo SIM vai determinar que a corrente aplicada conduza o ião selecionado para o segundo quadrupolo, o qual funciona como câmara de colisão onde se induz a fragmentação do ião molecular. Os fragmentos gerados são conduzidos de forma não seletiva para o terceiro quadrupolo e analisados os espectros de massa obtidos em modo DS, procedendo à eleição dos fragmentos a monitorizar em MRM e ao estudo das energias de colisão que determinam a maior intensidade para as transições, sem que o ião original deixe de surgir no espectro e represente cerca de 25% da abundância relativa [55,96].

A realização de espectrometria de massa *tandem* requer equipamentos com analisadores triplo-quadrupolo ou *ion-trap*, de modo a permitir a seleção/ejeção diferencial do ião molecular, e o estudo em modo MRM das fragmentações selecionadas para quantificação (MRM₁) e confirmação da identidade (MRM₂). A técnica de MS/MS apresenta enorme vantagem, por permitir um máximo de sensibilidade com um mínimo de ruído, essencial em análise vestigial. O estudo da fragmentação pode ainda contribuir para a obtenção de informação estrutural acerca das moléculas, uma vez que os fragmentos produzidos podem ser caraterísticos e corresponder à perda de grupos funcionais ou moleculares específicos [61,69].

6.2 Análise de brancos e interferentes

O potencial de serem introduzidos interferentes deve ser investigado durante a demonstração inicial de capacidade do método, através da preparação e análise de um branco de reagente (LBR – *Laboratory Reagent Blank*, composto apenas de fase móvel) e de um branco do método, em que o volume de amostra é substituído por água desmineralizada e extraído [55,83]. A análise de brancos adquire relevância no sentido de ser investigada a presença de contaminantes ou interferentes no material, equipamento ou solventes em uso, sendo ainda importante para o estabelecimento da linha de base e determinação da razão sinal/ruído [1]. Este procedimento tem o objetivo de assegurar que a contaminação do *background* (linha de base) não interfere com quantificação dos analitos, podendo estar instituída como boa prática laboratorial a inclusão do branco na calibração da instrumentação. Encontra-se convencionado que o valor registado para o branco não pode exceder um terço do sinal correspondente a um

padrão preparado ao nível do limite de quantificação, não devendo os ensaios de brancos por LC-MS/MS em nenhuma circunstância produzir picos mensuráveis para o mesmo tempo de retenção do determinando [55,83,98,99].

Em espectrometria de massa *tandem* o recurso à monitorização múltipla de reação (MRM – *Multiple Reaction Monitoring*) permite o decréscimo dos limites de deteção, por apenas ser realizada a leitura de massas específicas e obtido o aumento da razão sinal/ruído. Não poderá no entanto ser desconsiderado que mesmo numa técnica altamente seletiva e sensível como LC-ESI-MS/MS, utilizada com objetivos quantitativos, os resultados podem ser afetados por compostos co-eluídos presentes na matriz. Os interferentes matriciais podem competir com o analito de interesse para a ionização, estando a reatividade dependente da estrutura e propriedades químicas das moléculas [13,86,99].

A natureza e extensão da contaminação introduzida por interferentes da matriz vão depender consideravelmente da origem da água em análise, apresentando a SPE elevado valor para a retenção e triagem dos compostos de interesse, antes da sua separação efetiva por cromatografia líquida. A presença de níveis médios a elevados de carbono orgânico ou sólidos dissolvidos em amostras de campo pode causar efeito de supressão ou incremento da resposta instrumental ao analito. Estes efeitos de supressão/aumento da resposta resultam da influência de substâncias co-eluídas na ionização por *electrospray*, não estando o carácter quantitativo da técnica de MS/MS imune a esta condição [99]. No contexto de que a técnica analítica possa ser estendida a matrizes aquosas mais complexas, o método EPA1694 refere que este problema quantitativo poderá ser mitigado pelo recurso a um padrão interno marcado isotopicamente, mas que o mais importante e fundamental para o desempenho e repetibilidade da técnica por MS/MS é a otimização da separação cromatográfica [99]. Para minimizar os efeitos de matriz opta-se pelo recurso a técnicas de extração versáteis e bem desenvolvidas, nomeadamente a extração em fase sólida para a pré-concentração de amostra e eliminação (*clean-up*) de eventuais compostos interferentes presentes na amostra. Idealmente, o solvente utilizado na extração deverá eluir seletivamente o analito de interesse, solubilizando na menor extensão possível outras substâncias retidas e que possam representar interferências no processo analítico subsequente [83].

Uma vez que as amostras de água para consumo se apresentam como uma matriz pouco complexa, estabilizada no processo de amostragem e submetidas a um processo extrativo, não são de esperar dificuldades decorrentes da presença de interferentes que dificultem a realização do ensaio de forma quantitativa. A eventual sobreposição de picos no cromatograma de corrente iônica total, observada quando se realiza o ensaio de soluções multi-analito e aquisição em modo SCAN, pode ser solucionada por detecção seletiva dos compostos eluídos e monitorização das transições específicas no modo MRM. A seletividade da técnica não faz deste modo esperar que sejam encontrados para o mesmo tempo de retenção picos resultantes de outras substâncias ou componentes de matriz. O cumprimento desta condição permite definir uma gama de trabalho para níveis baixos de concentração, desde que adequada a razão sinal/ruído encontrada [5,55].

6.3 Monitorização de reação múltipla

6.3.1 Pesticida ometoato

As transições de massa em MRM propostas por *Harald et al.* para o ometoato estão apresentadas na Figura 18, constituindo critério de orientação para o trabalho experimental a realizar [100]. As estruturas dos iões representados correspondem a perdas de fragmentos por mecanismos nem sempre esclarecidos.

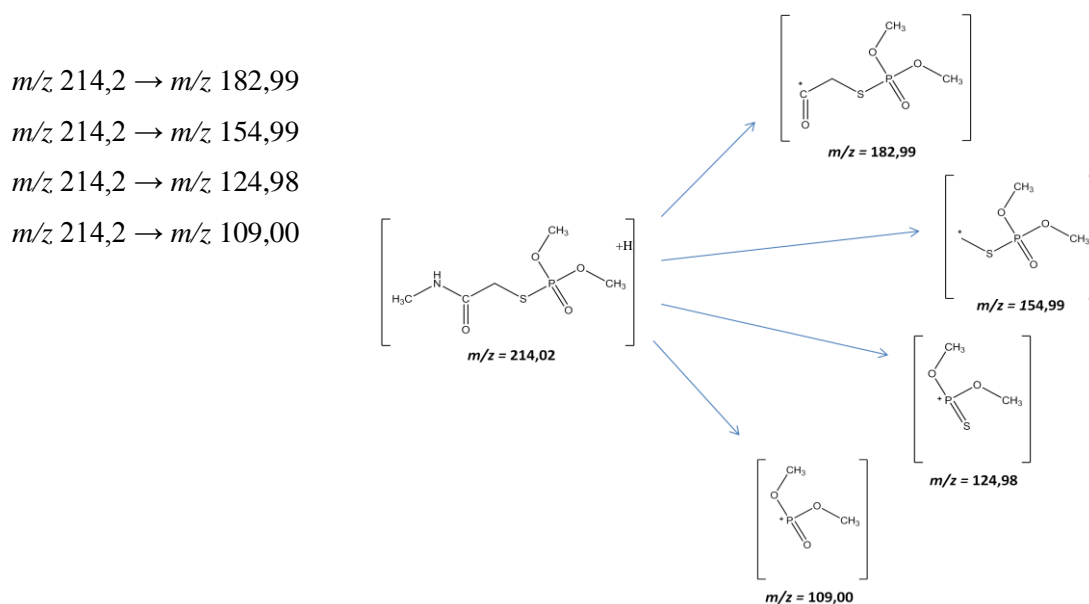


Figura 18 – Iões fragmento do ometoato, produzidos em MS/MS [100].

6.3.2 Acrilamida

A metodologia descrita em 2013 para determinação de acrilamida em águas por colaboradores da EPA utiliza AA deuterada como padrão para a fortificação, tendo em vista a calibração e quantificação pelo método do padrão interno e o cruzamento de informação acerca dos fragmentos a obter na detecção por MS/MS, no que respeita a concordância dos valores de m/z e perdas propostas para geração dos fragmentos selecionados. Estão apresentadas na Figura 19 os dois iões fragmento caraterísticos resultantes da fragmentação da molécula de AA [51]:

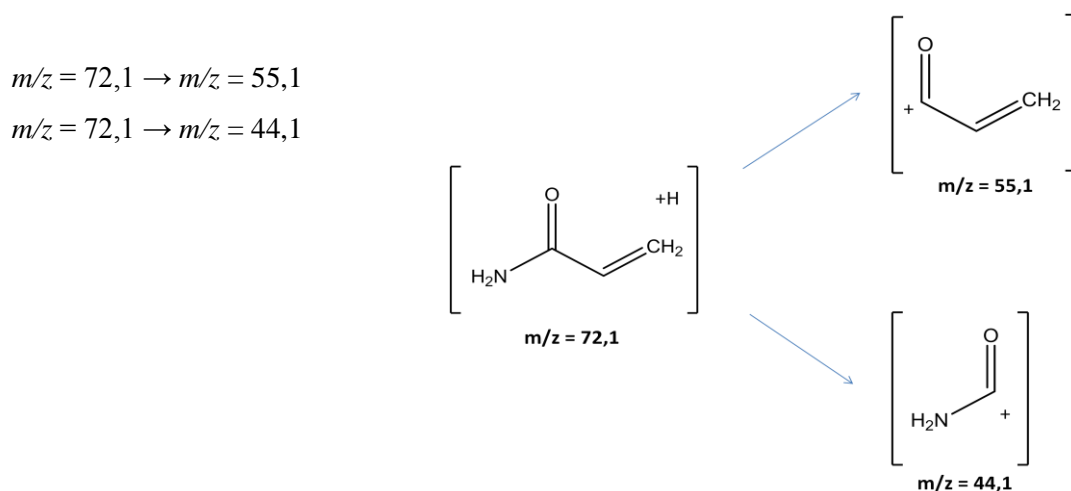


Figura 19 – Iões fragmento propostas para a acrilamida, na análise por MS/MS [51].

Na indisponibilidade de um padrão deuterado de AA, os estudos para validação do método serão realizados com recurso a padrões de acrilamida preparados e analisados por LC-MS/MS.

7 Validação de ensaios

A adequabilidade da metodologia de análise e confiança nos resultados produzidos tem de ser reconhecida e sustentada através da obtenção de consenso acerca dos parâmetros de validação essenciais, assumindo a concordância dos resultados um papel determinante para o desenvolvimento e validação de um método. O controlo de qualidade assume importância fundamental na execução rotineira de metodologias analíticas, estando as suas ferramentas estabelecidas como essenciais para a aceitação e credibilidade dos resultados apresentados [1,101,102].

As características de desempenho de métodos analíticos para a determinação dos parâmetros avaliados em águas de consumo estão especificadas no Decreto-Lei 306/2007, descrevendo que as técnicas de análise devem permitir no mínimo medir concentrações iguais ao valor paramétrico, considerado o cumprimento dos critérios para a exatidão, precisão e limite de deteção de dado parâmetro [3].

A divergência na construção de conceitos e o seu significado em metrologia têm despertado discussão relativamente à sua definição, pelo que esforços foram empreendidos para a construção de um único e consistente esquema conceptual que relaciona os termos a considerar seguidamente [103]:

7.1 Seletividade

Os conceitos de seletividade e especificidade são por vezes empregues indiferenciadamente, apesar de não corresponderem ao mesmo. A especificidade de uma técnica remete para a sua aplicação na determinação exclusiva de um analito, mesmo quando existam na matriz da amostra outros componentes e interferentes, enquanto a seletividade consiste na capacidade de um sistema diferenciar duas ou mais substâncias presentes em mistura, através de procedimentos protocolados ou optimização das condições de operação [102,104,105]. Em cromatografia líquida com deteção por MS/MS, a seletividade adquire relevância no sentido de os compostos de interesse poderem ser eluídos individualmente, ou monitorizados sem que a presença de substâncias co-eluídas ou interferentes dificultem a sua identificação.

7.2 Gama de trabalho

A calibração instrumental define o traçado de uma curva que relaciona a intensidade de sinal com a quantidade de analito presente, por recurso a padrões de concentração crescente preparados para o efeito. O controlo do ajuste da regressão compreende o cálculo dos coeficientes de correlação e determinação, podendo ainda ser registado o valor do declive. A gama de trabalho corresponde a um intervalo de concentrações para o qual o comportamento da resposta analítica foi estudado, apresentando como limites inferiores o limite de deteção (LD) e limite de quantificação (LQ), e um limite superior adaptado à necessidade de resposta para o ensaio, ou limitado pela capacidade de resposta linear/polinomial da instrumentação [104,105].

A calibração dentro de uma gama vai definir um intervalo de concentrações para o qual a resposta do método se encontra validada, sendo que em alguns métodos de ensaio a amostra pode ser diluída para que a resposta analítica caia dentro da gama de trabalho, estando o cálculo da concentração afetado do fator de diluição. Este procedimento constitui uma boa prática, tendo a observar que a diluição não deve exceder uma ordem de grandeza.

7.3 Linearidade

7.3.1 Teste de *Mandel*

Idealmente a resposta de um método analítico deve apresentar linearidade, para um intervalo de concentrações adequado ao que se pretende quantificar. A norma ISO 8466-1 propõe que a linearidade da resposta pode ser avaliada através de um modelo estatístico, em que a partir de um conjunto de pares ordenados são calculadas as funções de calibração linear e não-linear. As expressões polinomiais de primeiro e segundo grau apresentam 2 e 3 graus de liberdade respetivamente, pelo que os desvios padrão residuais podem ser calculados de acordo com:

$$S_{y1} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{N - 2}} \quad e \quad S_{y2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_{i2})^2}{N - 3}}$$

Onde N é o número de padrões de calibração, y_i o sinal obtido para um padrão de dada concentração, \hat{y}_i corresponde ao sinal estimado pela função linear de calibração e \hat{y}_{i2} à resposta estimada pelo modelo quadrático, para um padrão da mesma concentração [1,98,104].

O teste de *Mandel* é aplicado para determinar o tipo de regressão mais ajustado para a resposta em estudo, sendo inicialmente calculada a diferença de variâncias (DS^2) através da expressão:

$$DS^2 = (N - 2) \times S_{y1}^2 - (N - 3) \times S_{y2}^2$$

O valor teste (PG) é calculado e comparado com o valor de F tabelado na distribuição de *Fisher*.

$$PG = \frac{DS^2}{S_{y2}^2}$$

- Quando $PG \leq F$ a função polinomial não produz um melhor ajustamento dos pontos, e a função de calibração elegida é linear.
- Se $PG \geq F$ a função de calibração é não-linear.

7.3.2 Coeficiente de determinação (R^2)

A correlação dos pontos experimentais e o ajuste da regressão linear ou polinomial são ainda considerados através do valor do coeficiente de determinação R^2 , estando definido que este não deve ser inferior a um dado valor especificado, comumente com um grau de confiança de 95%. Considerada a minimização da soma dos quadrados dos resíduos para as equações polinomiais, deve ser avaliado o parâmetro R^2_{ajustado} para a escolha do polinómio que melhor traduz o ajuste dos padrões de calibração [1,98].

7.3.3 Teste de *Rikilt*

A relação de linearidade pode ser verificada através da realização do Teste de *Rikilt*, em que é calculada para cada ponto de calibração a razão y_i/x_i correspondente ao quociente da resposta instrumental relativa a cada nível de concentração. A

determinação do valor médio de y_i/x_i permite inferir um valor percentual para a resposta de cada padrão de calibração, sendo a linearidade avaliada pela dispersão dos valores percentuais em torno da razão de 100%.

7.3.4 Análise de resíduos

Um outro método para avaliar a linearidade da resposta é a análise de resíduos, sendo para isso necessário calcular o desvio padrão residual $S_{y/x}$ da reta de regressão linear:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{N - 2}}$$

O desvio padrão residual exprime a dispersão dos valores experimentais em torno da resposta estimada pela regressão linear, para cada valor padrão de concentração. A representação gráfica dos valores dos resíduos em função da concentração permitirá observar a distribuição aleatória dos resíduos ao longo da linha normal, evidência que confirma a linearidade da calibração, submetidos os valores de resíduos a aceitação dentro de um desvio percentual a definir [1,98,104,105].

7.3.5 Sensibilidade

O parâmetro sensibilidade traduz a variação da resposta analítica quando se analisam diferentes concentrações do determinando, correspondendo a um valor praticamente sobreponível ao declive quando se consideram regressões lineares simples:

$$S = \Delta y / \Delta c$$

Pode ser compreendido que um maior valor absoluto de sensibilidade permitirá diferenciar mais corretamente pequenos incrementos de concentração, quando estes provoquem a mensurável variação da resposta [104].

7.4 Limiares analíticos

Os limites analíticos correspondem à resposta instrumental que permite diferenciar a mais baixa concentração de analito do sinal obtido para uma amostra em branco, ou o mais pequeno valor de concentração passível de quantificar por um dado método. A aplicabilidade de uma técnica poderá depender da sua capacidade em analisar quantidades vestigiais ou residuais de um composto, adquirindo importância para a sua eleição os limiares analíticos como o limite de deteção (LD) e o limite de quantificação (LQ) [98,104,105].

O limite de deteção corresponde à menor concentração de substância a ser detetada na amostra, não sendo no entanto quantificada como valor correto. O conceito limite de deteção pode ser considerado semi-quantitativo, na medida em que corresponde ao valor mínimo de concentração que é possível distinguir do branco, ou seja, capaz de ser diferenciada de uma amostra sem analito. O método dos mínimos quadrados é utilizado para definir a regressão linear e calcular os limites de deteção e quantificação, através da aplicação de fórmula matemática aos valores de resíduos encontrados [98,105].

O limite de deteção pode ser calculado com base na razão sinal/ruído, para os métodos em que é possível medir a variação da linha de base, sendo o valor dado pela multiplicação da razão sinal/ruído por 3:

$$LD = 3 \times S_{y/0}$$

Alternativamente pode ser calculado com base no desvio padrão residual da curva de calibração ($S_{y/x}$) e no declive (m), através da expressão:

$$LD = \frac{|3 \times S_{y/x}|}{m}$$

O valor de LD determinado por um procedimento de medição é afetado de uma probabilidade de ser cometido um erro do tipo α em que se declara presente o analito quando este não é detetável, ou erro do tipo β em que se afirma ausente uma quantidade detetável. A IUPAC assume a determinação do valor de LD com um nível de confiança de 95%, pelo que uma leitura inferior ao LD significa que, de acordo com a probabilidade definida, o composto não existe na amostra em concentração detetável [103,105,106].

O limite de quantificação (LQ) tem como significado a menor concentração determinada instrumentalmente a partir da qual a quantificação do analito é possível com um nível de precisão adequado e aceitável (comum 10% a 20%), sendo pontualmente aceite maior coeficiente de variação para o LQ, comparativamente aos restantes padrões utilizados na calibração [98,105]. Na prática é usual assumir que o LQ corresponde ao limite de determinação, o qual por sua vez corresponde ao padrão de calibração de menor concentração. Em analogia com a determinação do LD, o valor de LQ pode ser calculado com base na razão sinal/ruído, para os métodos em que é possível medir a variação da linha de base, estando convencionado:

$$LQ = 10 \times S_{y/0}$$

ou, por recurso ao desvio padrão residual da reta de calibração ($S_{y/x}$) e ao declive da curva de calibração (m):

$$LQ = \frac{|10 \times S_{y/x}|}{m}$$

7.5 *Carry-over* ou arrastamento

Na eventualidade de existirem valores de concentração bastante distintos entre amostras analisadas sequencialmente pode ocorrer o denominado arrastamento, definido como a potencial contaminação com o composto alvo entre análises, em particular quando se analisa uma amostra pouco concentrada seguidamente a uma com elevada concentração. Os procedimentos têm de ser avaliados e otimizados para que esta eventual interferência seja evitada, por lavagem ou estabilização/regeneração adequadas entre as análises. Em metodologias que operem com amostras bastante carregadas, pode constituir prática comum a diluição de amostras para evitar os fenómenos de arrastamento, ou quando o enquadramento na gama de trabalho assim o exige. A investigação realizada por *Hughes* e *Wong* sugere que, sempre que não for possível eliminar este fenómeno, o procedimento de análise deve intercalar as amostras quantificáveis com a análise de brancos. As boas práticas poderão orientar a confirmação do resultado através de um método alternativo, com maior ou menor sensibilidade e limiar analítico [98,107].

7.6 Exatidão

O conceito de exatidão exprime a aproximação entre um valor medido e aquele considerado como verdadeiro para um mensurando, não estando atribuída à exatidão uma unidade de medida. A exatidão de um resultado deriva da combinação dos parâmetros de precisão ou fidelidade e veracidade ou justeza de medida, onde se refletem respetivamente a dispersão observada para um conjunto de resultados experimentais e a ocorrência de erros sistemáticos que determinam o seu consistente desvio relativamente ao valor assumido como real.

7.6.1 Precisão

A precisão é definida como um termo geral que pretende avaliar a dispersão de resultados entre ensaios repetidos sobre uma mesma amostra, ou amostras semelhantes, em condições constantes ou variáveis a definir. Deste modo, existirão duas medidas extremas para avaliar a dispersão dos resultados, designadas por repetibilidade e reprodutibilidade, estando entre elas uma condição em que variam alguns fatores, definida como precisão intermédia ou variabilidade intralaboratorial. O termo fidelidade de medição pode ser igualmente aplicado para descrever o conceito de precisão, estando descrita como a aproximação entre indicações ou valores obtidos através de medições repetidas, realizadas sobre o mesmo objeto ou objetos semelhantes, em condições especificadas, refletindo deste modo a variabilidade aleatória [103,104,108].

7.6.1.1 Repetibilidade

A concordância entre medições consecutivas realizadas sobre uma mesma amostra, decorrido o ensaio em condições idênticas de laboratório, analista, equipamento, lotes de reagentes e num curto intervalo de tempo, traduz a repetibilidade instrumental ou do sistema (réplicas ou alíquotas consecutivas de um mesmo padrão ou amostra).

A repetibilidade de um método pode ser estimada para cada nível de concentração, quando realizados ensaios independentes sobre soluções padrão, brancos, ou amostras fortificadas preparadas. A medida da repetibilidade é comumente expressa como desvio

padrão ou coeficiente de variação (desvio padrão relativo), permitindo em rotina definir critérios de aceitação para cada padrão/controlado do método [103,106,108]:

$$S_{ij} = \sqrt{\frac{\sum_i^j (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad e \quad CV_i(\%) = \frac{S_{ij}}{\bar{x}} \times 100$$

7.6.1.2 Precisão intermédia ou repetibilidade intermédia

O termo incide sobre a dispersão dos resultados quando a mesma amostra, ou amostras idênticas, são analisadas de acordo com o mesmo procedimento de ensaio e no mesmo laboratório, estando a variar uma ou mais condições, nomeadamente o analista, temperatura ou humidade atmosféricas. A repetibilidade intermédia vai ser estimada por medições repetidas sobre o mesmo objeto ou objetos semelhantes, podendo o estudo deste parâmetro compreender intervalos de tempo alargados, ou incluir novas calibrações do equipamento, padrões de controlo, operador ou sistema de medição [106,108].

Em concordância com o cálculo da repetibilidade do método, devem ser considerados ensaios independentes para cada branco, amostra ou padrão analisados, e o valor de precisão intermédia (SI) é determinado para cada nível de concentração, após exclusão de valores aberrantes. O cálculo de (SI) é realizado através de expressão matemática, estando o valor encontrado submetido a critérios de aceitação definidos em rotina [104,106,108]:

$$SI = \sqrt{\frac{1}{n - 1} \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}$$

7.6.2 Veracidade ou Justeza de medida

A veracidade ou justeza de medição descreve a aproximação entre a média de um número infinito de medidas sobre um mesmo objeto, comparativamente ao valor de referência, podendo ser referida como viés ou *bias* [103,104]. O estudo da exatidão é realizado através de ensaios de recuperação, análise de materiais de referência

certificados (MRC), quando existam, comparação do resultado com aquele produzido por um método de referência, ou por participação em ensaios interlaboratoriais (EIL) [1].

Considerando em simultâneo a veracidade de medida e a circunstância de o ensaio estar sujeito a variabilidade aleatória, podemos compreender que a exatidão e incerteza de uma medida dependem da conjugação destes dois fatores (Figura 20) [104,109]. O agrupamento das estimativas da precisão e veracidade irá ser considerado oportunamente para o cálculo da incerteza do método [98,110]. Como caso particular, podemos referir que em circunstâncias analíticas para as quais não seja possível eliminar o erro sistemático pode ser determinado um fator de correção, o qual é aplicado para retificar o valor da medida [106].

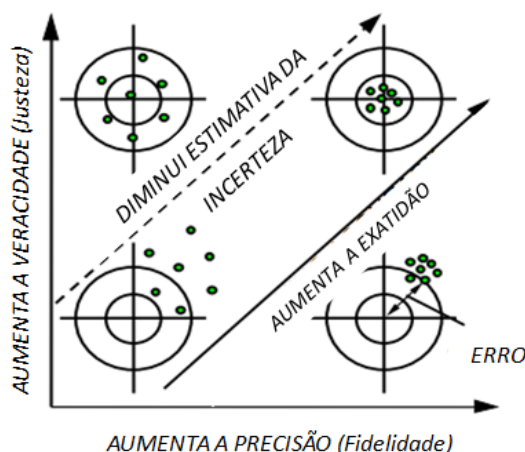


Figura 20 – Correlação entre Precisão e Veracidade de medida [109].

A realização de n ensaios independentes em t dias para os padrões preparados e o estudo complementar da recuperação permitem avaliar a precisão e veracidade do método, com vista a estimar a reprodutibilidade e consistência dos resultados experimentais [98,104]. A execução de uma metodologia analítica em rotina pressupõe um controlo de qualidade interno, no qual estarão definidos os critérios de aceitação para a exatidão dos padrões de controlo e resultados dos ensaios de recuperação, contemplando ainda a dispersão encontrada na análise de replicados, quando existam [1,98,109].

7.7 Incerteza do método

O cálculo da incerteza associada a um resultado encontra-se descrito em diversos manuais e guias para consulta, entre os quais o *Eurachem* e *Nordtest*, ou documento publicado pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC) [110–112]. A estimativa da incerteza associada ao método pode ser inferida de diferentes modos:

A incerteza pode ser calculada considerando o contributo de cada fonte de incerteza como componente aditiva, numa abordagem *bottom-up* para atingir um valor $\mu(y)$ a associar ao resultado [111].

O valor da incerteza associada a métodos instrumentais resulta da combinação da incerteza associada à precisão, estimada a partir de ensaios/leituras independentes de padrões ou duplicados, e da incerteza associada à veracidade, considerado o desvio dos resultados em ensaios de recuperação, ensaios interlaboratoriais, ou análise de MRC's [1,98,108].

A incerteza associada ao método será oportunamente calculada no tratamento e validação dos dados experimentais do trabalho a desenvolver.

7.8 Robustez

A capacidade de uma metodologia produzir resultados válidos de forma coerente e consistente é determinada pela robustez do método. Esta consiste portanto numa avaliação da capacidade do método em manter um desempenho adequado, nas condições ambientais do laboratório e considerando o modo como a sua variação afeta a fiabilidade dos resultados [102]. A sala de cromatografia encontra-se climatizada por motivo de uniformidade das condições ambientais, e com vista a diminuir a volatilização de solventes orgânicos utilizados na técnica de cromatografia líquida. A nível da instrumentação, a câmara do amostrador e a coluna de separação encontram-se termostalizadas, contribuindo ambos os fatores para estabilidade no processo analítico, em termos de precisão intermédia afetada por variações sazonais. O conceito abrange ainda fatores como a utilização de diferentes marcas ou lotes de solventes, padrões dos compostos em análise, material de laboratório de uso corrente e aquele específico da cromatografia, ou ainda as soluções de trabalho preparadas. A influência do fator

humano e a variabilidade processual ou instrumental podem também ser contempladas, determinando em conjunto uma medida da coerência e consistência dos resultados apresentados por uma metodologia analítica [102].

8 Enquadramento de ensaios para a acreditação de laboratórios químicos

Um laboratório de ensaio e/ou calibração pode pedir a acreditação do seu desempenho por parte das entidades competentes, como consta da norma Portuguesa NP EN ISO/IEC 17025:2005, considerando o reconhecimento da competência técnica e qualidade dos serviços por ele prestados [101].

A validação técnica dos resultados e a implementação de um sistema de gestão da qualidade são ferramentas indispensáveis e obrigatórias para obter o reconhecimento e acreditação pela entidade competente (Instituto Português de Acreditação – IPAC), demonstrando e transmitindo a confiança depositada nos resultados emitidos em boletins de análise. Neste contexto, a validação de uma metodologia tem como principal objetivo sustentar a qualidade e confiança dos serviços prestados, constituindo um meio para atingir a qualidade através de um processo integrado e contínuo, sinónimo de excelência [101,102].

Os resultados apresentados em boletim de análise devem transmitir de forma tecnicamente clara e correta toda a informação relevante para a sua interpretação, obedecendo a critérios de algarismos significativos e unidades de medida a apresentar, os quais devem estar em concordância com a legislação e normas de ensaio. As regras para definir o número de algarismos significativos a constar do resultado devem ser estabelecidas de acordo com a legislação ou norma de ensaio, devendo o número de algarismos incertos a constar da incerteza ser idêntico àquele expresso no resultado [1].

Os valores experimentais inferiores ao LQ devem ser apresentados inequivocamente, com a indicação de se encontrarem não superiores ao valor estipulado. A expressão de resultados em que uma das parcelas se encontre abaixo do LQ pode ser feita de acordo com uma das regras descritas na legislação e regulamentação vigente, devendo sempre ser referida a forma como foi calculado. Todas as orientações para a expressão de resultados de forma correta e adequada podem ser consultadas no guia IPAC para a acreditação de laboratórios químicos [1].

9 Material e métodos

Este ponto apresenta numa primeira parte o equipamento e material de laboratório, e os reagentes e padrões utilizados na preparação das soluções de pesticida e acrilamida. São ainda especificadas as fases móveis e referenciados os gases utilizados na técnica de extração em fase sólida e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa.

Os processos envolvidos no desempenho do método analítico encontram-se seguidamente descritos, com a exposição das etapas e condições especificadas para a realização da SPE e análise por LC-MS/MS.

9.1 Equipamento e material:

Tabela 3 – Especificações de equipamento e *software* utilizados nas análises.

Extração em Fase Sólida:
<i>Caliper Life Sciences® – Auto Trace SPE Workstation</i>
<i>Caliper Life Sciences® – Turbo Vap LV Concentration Workstation</i>
Cromatografia Líquida e Espectrometria de Massa:
<i>ACQUITY® Ultra Performance – Binary Solvent Manager – Waters</i>
<i>ACQUITY® Ultra Performance – Sample Manager – Waters</i>
<i>ACQUITY® Ultra Performance – TQ Detector – Waters</i>
Fase estacionária e sistema de aquisição de dados:
<i>Coluna ACQUITY® UPLC HSS T3 2.1x150mm 1.8µm</i>
<i>Software MassLynx versão 4.1</i>
Outros equipamentos:
<i>Balança analítica</i>
<i>Banho de Ultra-Sons</i>

Tabela 4 – Material de laboratório e consumíveis para a execução dos procedimentos de análise.

Tubos de Vidro 15mL
Tubos de vidro graduados 1mL
Frascos <i>Schott</i> ® 500mL
Vials 12x32mm com septo PTFE/silicone
Microespátula
Microseringas
Vidros de relógio
Filtros de nitrocelulose – porosidade 1,2 µm
Material volumétrico e material corrente de laboratório
Cartuchos Waters <i>Oasis</i> ®HLB
Cartuchos J.T.Baker- <i>Bakerbond Carbon</i> ®

9.2 Reagentes e soluções

9.2.1 Reagentes

Tabela 5 – Solventes e sais inorgânicos.

Metanol – grau HPLC ou equivalente
Água Desmineralizada Ultra Pura – <i>Milli-Q</i> ® (Millipore, Bedford, MA)
Acetato de Amônio (s) – puríssimo (p.a.) para espectrometria de massa ou equivalente
Éter Dietílico – p.a.
Tiosulfato de Sódio Pentahidratado [Na ₂ O ₃ S ₂ .5H ₂ O]

Tabela 6 - Padrões dos compostos - qualidade analítica reconhecida para cromatografia:

Ometoato	Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany)	Pureza: 98,0%
Lote: 00628	Validade: 08/2014	Armazenamento: 4°C ± 4°C
Ometoato	Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany)	Solução 10 ng/µL em acetonitrilo
Lote: 21022AC	Validade: 12/2015	Armazenamento: 4°C ± 4°C
Acrilamida	Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany)	Pureza: 99,0%
Lote: 11221	Validade: 12/2015	Armazenamento: 4°C ± 4°C

9.2.2 Soluções

9.2.2.1 Análise de Pesticidas – ometoato

Fases Móveis:

As fases móveis utilizadas são uma mistura binária de metanol e solução tampão aquosa de acetato de amónio com pH = 4,8 a 20°C.

Fase móvel A: Acetato de amónio 5mM/Metanol [90/10 (v/v)]

Fase móvel B: Acetato de amónio 5mM/Metanol [10/90 (v/v)]

Soluções Padrão Individuais:

Solução Padrão *stock* de ometoato (200mg/L) em metanol

Solução Padrão intermédia de ometoato (2mg/L) em metanol

O armazenamento dos padrões vai ser feito em recipiente de vidro âmbar, sob refrigeração entre 2°C e 8°C e ao abrigo da luz. O prazo de utilização destas soluções deve ser especificado, sendo rejeitadas quando apresentem sinais de degradação ou tenha expirado o prazo de validade do padrão comercial [1]. A observar que os desvios de massa registados na preparação da solução *stock* devem ser considerados para aferir o mais corretamente possível a concentração da solução intermédia [55].

Soluções de trabalho

Solução-Mãe Padrão de Calibração: preparada por diluição de um volume medido da solução padrão intermédia em metanol, apresenta a concentração de 50µg/L e tem utilização na preparação dos padrões de calibração e padrões fator de resposta.

Solução-mãe Padrão de Controlo: apresenta um valor de concentração igual à solução-mãe padrão de calibração, sendo preparada de modo idêntico e com prazo máximo de utilização por igual período. Esta solução de trabalho é utilizada para preparar os padrões de controlo e ensaios de recuperação.

9.2.2.2 Acrilamida

Fase móvel: Água desmineralizada/Metanol [60:40 (v/v)]

Soluções Padrão Individuais:

Solução Padrão *stock* de acrilamida (200 mg/L) em metanol

Solução Padrão intermédia de acrilamida (5 mg/L) em metanol

O armazenamento dos padrões vai ser feito em recipiente de vidro âmbar, sob refrigeração entre 2°C e 8°C e ao abrigo da luz. O prazo de utilização destas soluções deve ser especificado, sendo rejeitadas quando apresentem sinais de degradação ou tenha expirado o prazo de validade do padrão comercial [1]. A observar que os desvios de massa registados na preparação da solução *stock* devem ser considerados para aferir o mais corretamente possível a concentração da solução intermédia.

Soluções de trabalho

Solução-Mãe Padrão de Calibração: preparada por diluição de um volume medido da solução padrão intermédia em metanol, apresenta a concentração de 500µg/L e tem utilização na preparação dos padrões de calibração e padrões fator de resposta.

Solução-mãe Padrão de Controlo: apresenta um valor de concentração igual à solução-mãe padrão de calibração, sendo preparada de modo idêntico e com prazo máximo de utilização por igual período. Esta solução de trabalho é utilizada para preparar os padrões de controlo e ensaios de recuperação.

9.3 Gases

Azoto

O caudal de gás assume importância fundamental para a nebulização e dessolvatação dos iões na fonte de ionização. O azoto gasoso encontra ainda utilização na etapa de secagem dos cartuchos de SPE, e como gás auxiliar na evaporação do solvente utilizado na extração [96].

Árgon

Elevada pureza, utilizado como gás de colisão em espectrometria de massa *tandem* [96].

9.4 Procedimento de extração em fase sólida

9.4.1 Pesticidas

A extração de um volume definido de amostra e a sua concentração a uma alíquota rigorosamente medida são determinantes para que sejam investigados os limites de quantificação ambicionados, enquadrando o método para a determinação dos níveis vestigiais de pesticida a potencialmente existirem em águas destinadas ao consumo humano.

Especificação das etapas de SPE:

- Lavagem prévia do sistema automatizado com 1mL de éter etílico.

- Condicionamento:

Ativação da fase estacionária *Oasis®*HLB (6mL/200mg) por passagem sequencial de volumes dos solventes descritos, a um caudal de 15mL/min:

- 3mL de éter dietílico
- 3mL de metanol
- 3mL de água desmineralizada

- Carregamento da amostra/padrão – com a passagem de 500mL + 10mL pelo sistema, a um caudal de 10mL/min. O volume de amostra efetivamente carregado é acrescido de 10mL para assegurar a passagem do volume de amostra que ocupa o volume morto do sistema.

- Secagem, com fluxo de gás azoto durante 55 minutos.

- Eluição com 5mL + 3mL de metanol, aos caudais de 20mL/min e 5mL/min respetivamente, e colheita do volume em tubo de vidro [55].

Evaporação do extrato e reconstituição do resíduo:

Evaporação à secura a temperatura de 35°C e sob corrente controlada de azoto, determinando a evaporação gradual e sem projeção de extrato. Este procedimento reduz a potencial decomposição térmica de algum composto, assim como elimina perdas ou espalhamento causado pela evaporação tumultuosa.

A reconstituição do resíduo é feita com 500µL de fase móvel A, agitado no vórtice e acondicionado em *vials* a colocar no amostrador automático do cromatógrafo. Os extratos retomados devem ser mantidos sob refrigeração (entre 2°C e 8°C) até ao momento de análise [55].

9.4.2 Acrilamida

O procedimento de extração em fase sólida e pré-concentração de acrilamida foi adaptado a partir da nota de aplicação do fabricante descrita para cartuchos de carvão ativado *Bakerbond*[®], com o extrato a ser evaporado a volume reduzido e aferido de modo a ser atingido um fator de concentração de 500x. O ensaio de condições experimentais e a sua discussão como contributo para a definição do protocolo de extração e pré-concentração são apresentados seguidamente:

9.4.2.1 Otimização do processo de extração

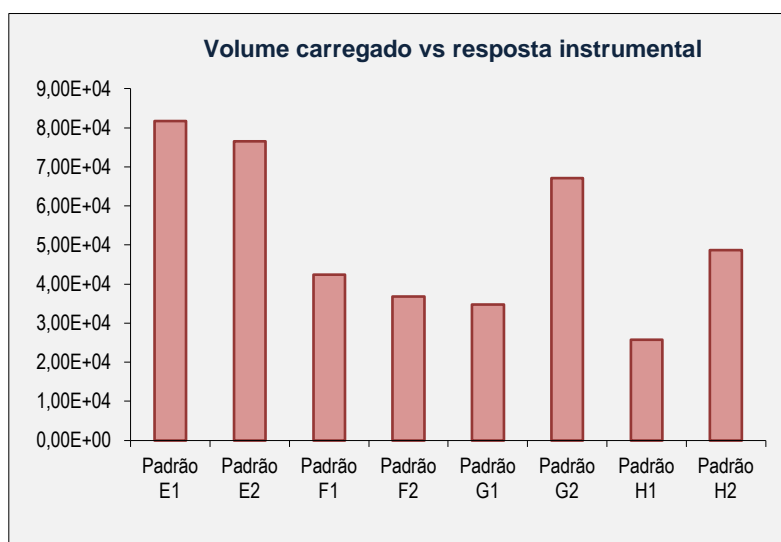
Volume de amostra

O trabalho experimental realizado teve como objetivo avaliar a retenção de acrilamida pela fase estacionária de carvão ativado, tendo para o efeito carregado diferentes volumes de solução padrão 5µg/L de acrilamida e procedido à concentração do extrato. Os reduzidos volumes constituíram uma limitação técnica para que fosse atingido idêntico fator de concentração, motivo pelo qual todos os concentrados foram aferidos a 1mL e se tenha procedido a diluições para atingir os mesmos níveis de concentração (Tabela 7):

Tabela 7 – Planeamento dos ensaios e resposta instrumental no estudo do volume de amostra para SPE.

Análise	Resposta	CV (%)	Volume carregado	Volume final	Concentração atingida	Diluição
Padrão E1	8,18E+04	4,73	100mL	+/- 0,5mL Aferir 1mL	500µg/L	Sem diluição
Padrão E2	7,65E+04					
Padrão F1	4,24E+04	10,00	200mL	+/- 0,5mL Aferir 1mL	1000µg/L	Diluir 2x 500µL+500µL fase móvel
Padrão F2	3,68E+04					
Padrão G1	3,47E+04	45,01	500mL	+/- 0,5mL Aferir 1mL	2500µg/L	Diluir 5x 200µL+800µL fase móvel
Padrão G2	6,71E+04					
Padrão H1	2,57E+04	43,72	1000mL	+/- 0,5mL Aferir 1mL	5000µg/L	Diluir 10x 100µL+900µL fase móvel
Padrão H2	4,87E+04					

Os ensaios foram realizados em duplicado, estando a resposta instrumental para cada volume carregado (Tabela 7) representada no gráfico da Figura 21. Uma primeira análise indica o volume de 100mL de padrão como aquele que representa o melhor compromisso entre o volume carregado e a resposta analítica. Eventualmente poderá ser considerada a eluição simultânea de acrilamida quando se carregam maiores volumes de padrão, não afetando no entanto a ordem de grandeza da resposta instrumental.

**Figura 21 – Intensidade de resposta dos padrões analisados na otimização do volume carregado para a SPE de acrilamida.**

Apesar de todos os resultados evidenciarem a eficaz retenção de acrilamida pela fase estacionária, o estudo apresenta carácter pouco conclusivo, uma vez que foi observada

crescente variabilidade na resposta para os padrões em que se procedeu à medição de menor volume para a sua diluição (Tabela 7). A representatividade limitada do número de ensaios considerados leva a que estes sejam interpretados com cautela.

As condicionantes técnicas de manipulação de volumes e o fator de concentração ambicionado determinaram que o volume selecionado fosse de 500mL, concordantemente com a sugestão da nota de aplicação do fabricante dos cartuchos.

Etapa de concentração

As perdas de acrilamida documentadas quando se evapora o extrato a resíduo seco foram investigadas numa experiência em que se prepararam em duplicado padrões 500µg/L de acrilamida em metanol e se procedeu à concentração do extrato a volume reduzido, ou alternativamente a evaporação à secura com posterior reconstituição do resíduo [51]. Os extratos evaporados foram aferidos a um volume final de 1mL, sendo atingido um fator de concentração de 10x para o extrato concentrado. O planeamento da atividade experimental e a resposta para cada um dos padrões encontram-se apresentados na Tabela 8, em que um dos grupos foi aditivado de ácido fórmico a uma concentração 0,1% (v/v), com o fundamento de avaliar a estabilidade da molécula e a representatividade do padrão concentrado [113].

Tabela 8 – Planeamento experimental e estudo da etapa de concentração do extrato de SPE.

Análise	Resposta	Concentração inicial e aditivo	Evaporação
Padrao A1	1,84E+05	50µg/L	+/- 0,5mL
Padrao A2	1,44E+05		
Padrao B1	9,41E+03	50µg/L	secura
Padrao B2	5,36E+03		
Padrao C1	2,89E+05	50µg/L + 0,1% ácido fórmico	+/- 0,5mL
Padrao C2	4,90E+05		
Padrao D1	2,54E+04	50µg/L + 0,1% ácido fórmico	secura
Padrao D2	6,70E+03		

Os resultados apresentados na Figura 22 evidenciam a perda de acrilamida quando o extrato é evaporado à secura, estando propostas como causas a volatilização da acrilamida ou o comprometimento da sua estabilidade química.

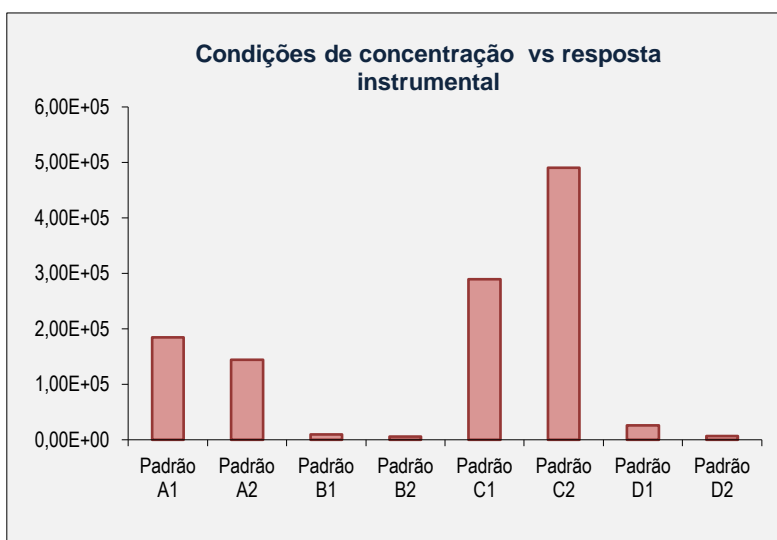


Figura 22 – Intensidade de resposta dos padrões analisados no estudo da etapa de concentração do extrato.

A interpretação considerada determinou que a concentração do extrato a um volume reduzido constituísse a alternativa escolhida, em detrimento da evaporação à secura e posterior reconstituição, uma vez que esse processo provocou a diminuição da resposta instrumental. A presença de ácido fórmico a 0,1% indicou ser um fator a afetar positivamente a intensidade de sinal, verificando no entanto a maior variabilidade da resposta. Deste modo, foi privilegiada a escolha do procedimento mais simples e expedito, e para o qual, apesar do reduzido número de ensaios realizados, foi observada maior consistência nos resultados. Futuramente pode ser proposto o ensaio de diferentes concentrações volúmicas de ácido, com o objetivo de avaliar de modo mais aprofundado o efeito deste fator na concentração do extrato.

Em continuação estão descritas as etapas do procedimento de extração em fase sólida e concentração dos padrões/amostras para a determinação de acrilamida.

Especificação das etapas de SPE:

- Lavagem prévia do sistema automatizado com 1mL de éter etílico.
- Condicionamento:

Ativação da fase estacionária *Bakerbond*[®] (6mL/1g) por passagem sequencial dos volumes de solvente, a um caudal de 5mL/min:

- 8mL metanol
- 8mL água desmineralizada

- Carregamento da amostra/padrão – com a passagem de 500mL + 10mL pelo sistema, a um caudal de 10mL/min. O volume de amostra efetivamente carregado é acrescido de 10mL para assegurar a passagem do volume de amostra que ocupa o volume morto do sistema.
- Secagem, com fluxo de gás azoto durante 15 minutos.
- Eluição com $2 \times 5\text{mL}$ de metanol ao caudal de 2mL/min e colheita do volume em tubo de vidro [113].

Concentração do extrato:

Evaporação a volume reduzido à temperatura de 35°C e sob corrente controlada de azoto, promovendo a evaporação gradual e sem projeção do extrato. As condições do processo reduzem a potencial polimerização causada pelo aquecimento e diminuem as perdas e espalhamento decorrente da evaporação tumultuosa. O volume de extrato é aferido a 1mL com água desmineralizada em tubo graduado, homogeneizado e acondicionado em *vials* mantidos sob refrigeração até ao momento da análise [113].

9.5 Método cromatográfico

9.5.1 Pesticidas

As especificações de caudal, temperatura do sistema, fases móveis e programa de eluição em gradiente foram definidas com base em artigos publicados e aplicações do fabricante para a determinação de pesticidas por LC-MS/MS [13]. As definições do *Inlet Method* constantes na Tabela 9 instruem o sistema em termos de desempenho do processo cromatográfico para análise multi-pesticida praticada no Cesab [55].

Tabela 9 – Método cromatográfico para a análise de pesticidas.

Parâmetros		
Caudal	0,400mL/min	
Temperatura da coluna	50°C	
Temperatura do amostrador	10°C	
Volume de lavagem	1000µL	
Programa de eluição em modo de gradiente		
Tempo	Fase móvel A	Fase móvel B
0,00 min	90%	10%
0,00 – 13,00 min	0%	100%
13,00 – 15,0 min	90%	10%

- Os objetivos deste trabalho compreendem a inclusão do método para a determinação de ometoato no procedimento multi-pesticida praticado em rotina. A etapa final do método cromatográfico corresponde à regeneração e estabilização das condições iniciais.

9.5.2 Acrilamida

As definições do processo cromatográfico foram adaptadas a partir do método descrito por *DeArmond et al.* para a determinação de acrilamida em amostras ambientais aquosas, tendo avaliado a influência da temperatura no tempo de retenção do composto. O efeito deste fator no tempo de retenção da acrilamida foi estudado através da realização de 4 ensaios consecutivos de uma solução padrão 50µg/L a cada uma das temperaturas testadas, respetivamente 25°C, 30°C e 40°C. A sobreposição dos cromatogramas apresentada na Figura 23 permite visualizar a inexistência de diferença sognificativa entre os tempos de retenção para as temperaturas experimentadas, podendo discutir os aspetos como o tailing ou arrastamento dos picos. Apesar de não ser a experiência para a qual foi observada maior eficiência, foi selecionada a temperatura T=30°C, com o valor de Tr=1,92 minutos a constituir indicação para os estudos de validação a serem apresentados no ponto 10 da presente tese.

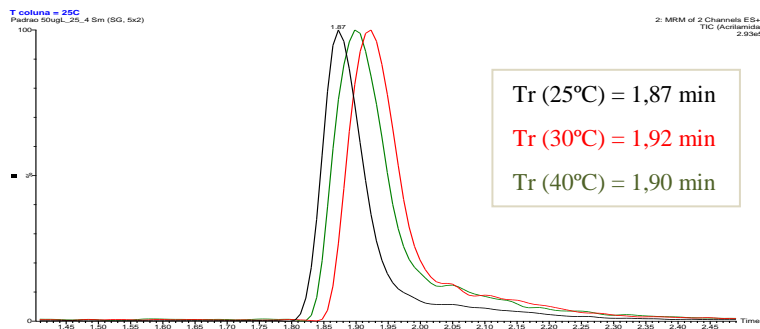


Figura 23 – Efeito da temperatura de análise no tempo de retenção da acrilamida.

Os parâmetros especificados na Tabela 10 compreendem as condições de caudal e temperatura da coluna selecionadas para a cromatografia líquida com eluição em modo isocrático [51].

Tabela 10 – Método cromatográfico para a análise de acrilamida.

Parâmetros	
Caudal	0,200mL/min
Temperatura da coluna	30°C
Temperatura do amostrador	10°C
Volume de lavagem	1000µL
Eluição em modo isocrático	
Tempo	Fase móvel
0,00 – 4,00 min	Água - Metanol 60/40 (v/v)

9.6 Espectrometria de massa

9.6.1 Especificação dos parâmetros de operação do espectrómetro de massa

9.6.1.1 Pesticida ometoato

As definições operacionais de espectrometria de massa são introduzidas na denominada *Tune Page*, onde se descrevem os parâmetros de ESI que influenciam a ionização dos compostos. De entre as condições a especificar estão a temperatura da fonte de ionização e a voltagem do cone, as quais podem afetar a estabilidade química dos determinandos. Os restantes parâmetros compreendem o caudal de gás de nebulização, o qual assume importância para a formação da pluma e pode causar flutuação no vácuo do sistema, e ainda a abertura de fenda e especificações de resolução do analisador [55,96]. As principais condições da *Tune Page* utilizadas em MRM na análise do pesticida ometoato estão apresentadas na Tabela 11:

Tabela 11 - Principais parâmetros da *Tune Page* na análise de pesticidas.

Modo de ionização	ESI(+)
Gás de nebulização	Azoto
Gás de colisão	Árgon
Voltagem do capilar	3kV
Temperatura da fonte de ionização	120°C
Temperatura de dessolvatação	350°C

A voltagem do capilar e temperaturas utilizadas são idênticas às pré-definidas para o método multi-análito praticado em rotina, inclusivamente no que respeita a resolução dos analisadores quadrupolares para cada modo de aquisição (não apresentado).

9.6.1.2 Acrilamida

A experimentação e aquisição de dados nas condições de operação idênticas às utilizadas na análise de pesticidas (Tabela 11) determinou que os parâmetros de espectrometria de massa sejam mantidos no método para a quantificação de acrilamida.

9.6.2 Otimização das condições de MS/MS

9.6.2.1 Pesticida ometoato

Voltagem do cone

O estudo do tempo de retenção característico e a otimização das condições de ensaio foram realizados por injeção de uma solução padrão individual 200µg/L de ometoato em fase móvel A e aquisição do espectro de massa, tendo procedido ao ensaio de valores crescentes de voltagem do cone com o objetivo de escolher o intervalo de valores para os quais seja obtida a maior intensidade de sinal e sensibilidade para o ião precursor.

Os espectros de SCAN correspondentes a cada pico do cromatograma foram observados para inferir acerca do tempo de retenção do pesticida, por ser observada a presença da razão m/z esperada para o ião molecular $[M+H]^+$, eluído a dado tempo de retenção. O estreitamento do intervalo de voltagens experimentadas, e a aquisição em modo SIM da razão massa/carga correspondente a $[M+H]^+$ permitem uma maior acumulação de leituras e a obtenção de sinais mais intensos em valor absoluto, procedendo ao afinamento da voltagem ideal para a fonte de ionização. A intensidade do ião precursor gerado para diferentes voltagens de cone está representada na Figura 24, quando se varia a voltagem a intervalos regulares para o modo SIM:

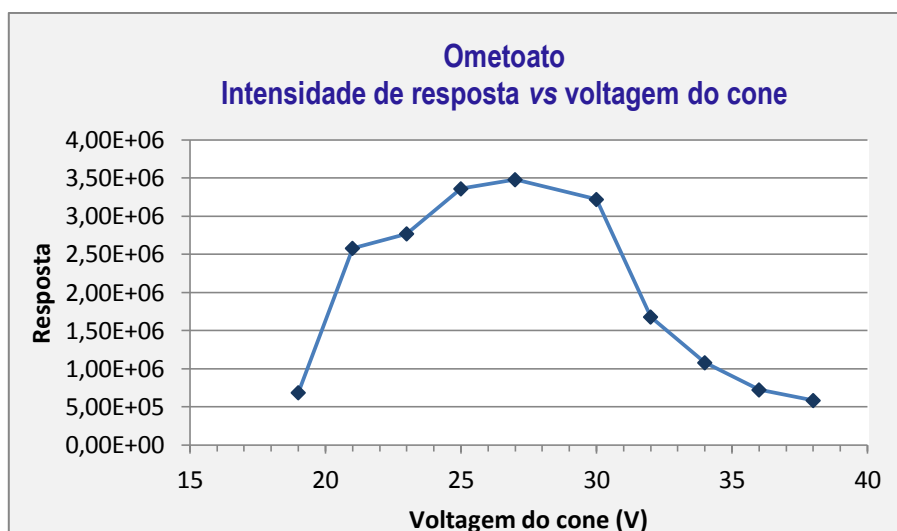


Figura 24 – Intensidade da resposta em função da voltagem do cone, para o modo SIM de aquisição.

Os ensaios preliminares em modo SCAN permitiram avaliar o comportamento cromatográfico do omotoato, determinando um tempo de retenção médio $T_r=1,96$ minutos, com a aquisição a ser realizada entre os zero e os 4,00 minutos. A observação do gráfico em SIM que relaciona a intensidade de resposta com a voltagem do cone sugere a utilização de uma voltagem = 27 Volt.

Energia de Colisão: Estudo da fragmentação

A otimização das condições de MS/MS prossegue com o varrimento da energia de colisão e estudo da fragmentação do ião molecular, com a aquisição de dados a ser feita em modo DS. Os espectros de massa e os iões fragmento gerados são observados para definir um valor de energia de colisão que idealmente produza pelo menos dois fragmentos caraterísticos, com a maior intensidade, e em que o ião precursor permaneça no espectro de massa com uma abundância relativa de aproximadamente 25% (Figura 25) [55]. Na análise do espectro foi identificada a razão $m/z = 214$ referente ao ião molecular, e os picos correspondente aos iões fragmento documentados para o omotoato, nomeadamente $m/z = 155$, $m/z = 125$ e $m/z = 109$ [100].

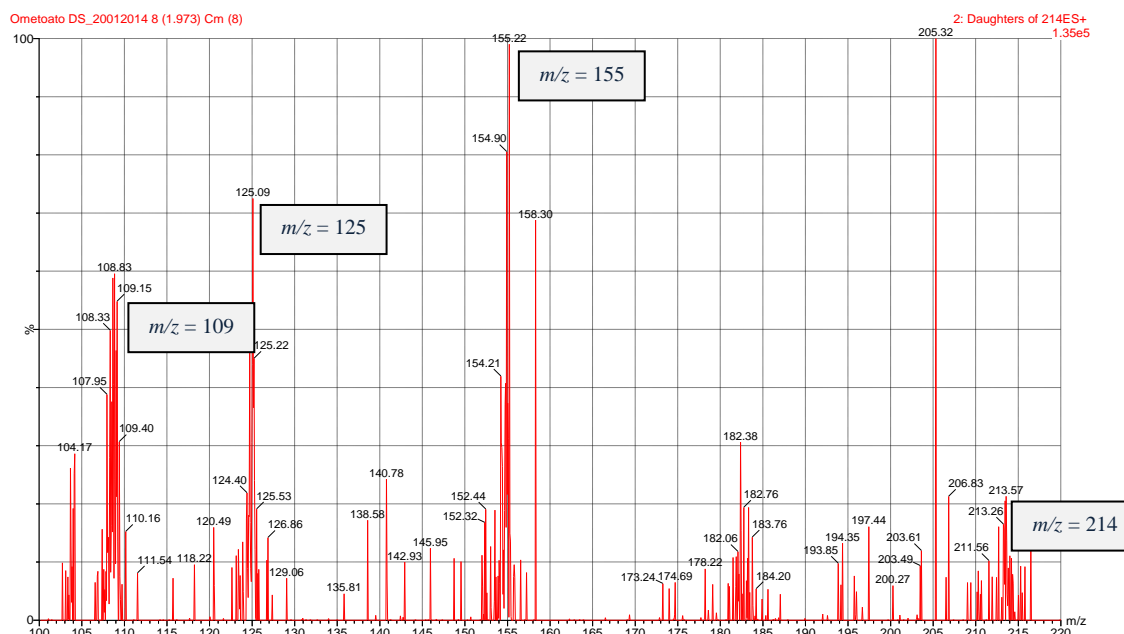


Figura 25 – espectro de massa adquirido em modo DS para uma energia de colisão de 25eV.

As intensidades do ião precursor e dos iões fragmento selecionados estão apresentadas na Tabela 12, quando se procede ao varrimento da energia de colisão e aquisição em modo DS, com o estudo da fragmentação a ser representado no gráfico de dupla entrada da Figura 26.

Tabela 12 - Estudo da fragmentação: intensidades do ião precursor e iões fragmento, registadas em DS.

Energia de Colisão (eV)	Ião Pai (m/z=213,57)	MRM ₁ (m/z=125,09)	MRM ₂ (m/z=108,83)
15	5,16E+05	1,20E+05	2,04E+05
20	2,28E+05	4,09E+05	2,24E+05
25	1,20E+05	5,19E+05	5,75E+05
30	8,04E+04	5,28E+05	8,21E+05
35	5,94E+04	4,36E+05	6,93E+05
40	3,73E+04	1,73E+05	4,30E+05

A linha selecionada apresenta as intensidades do ião molecular e iões fragmento selecionados, correspondentes a uma abundância relativa de 100% para MRM₂, 90,26% para MRM₁ e 20,87% para o ião precursor, quando aplicada uma energia de colisão = 25eV.

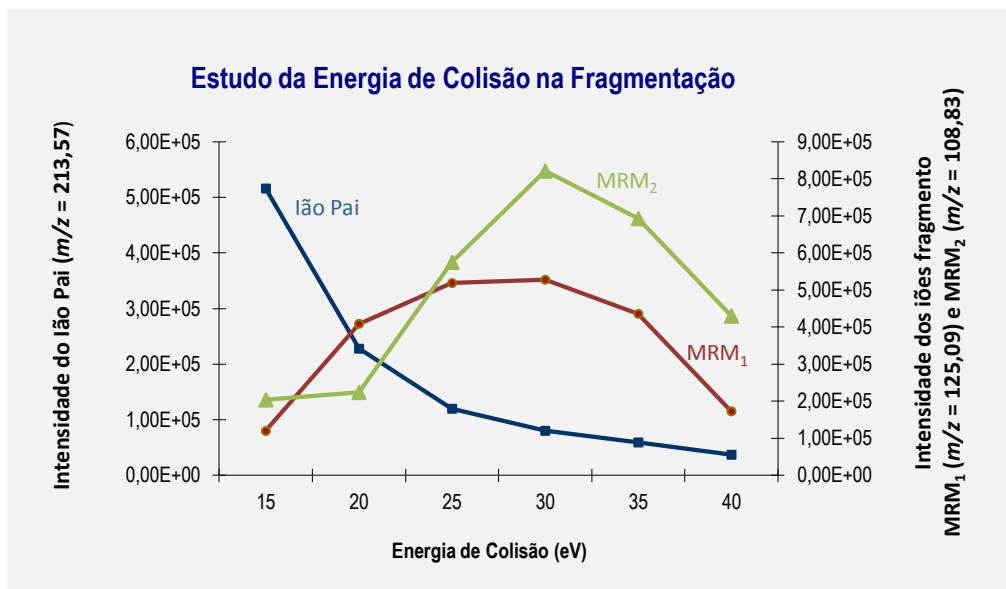


Figura 26 – Intensidade de resposta do Ião molecular e Iões fragmento adquiridos em DS.

Nesta fase da otimização são escolhidas as fragmentações a ensaiar em modo MRM, definindo como fragmentos de quantificação (MRM₁) e confirmação da identidade (MRM₂) aqueles para os quais seja obtida a maior intensidade de resposta, verificada a prevalência do Ião pai em cerca de 25% no espectro de massa e calculado o valor característico para a razão de intensidades [MRM₁/MRM₂].

A maior intensidade de resposta para os dois fragmentos selecionados foi observada nos ensaios em MRM quando se aplicou uma energia de colisão = 25eV, com a razão de intensidades [MRM₁/MRM₂] a apresentar um valor próximo da unidade, motivo porque foi selecionado este valor para a energia de colisão.

Em resumo, o processo de otimização tem o objetivo de definir os parâmetros experimentais de voltagem do cone e energia de colisão para a realização de MS/MS, estando compilados na Tabela 13 o tempo de retenção característico para o ometoato e as condições de aquisição em modo MRM, com referência aos fragmentos de quantificação (MRM₁) e confirmação da identidade (MRM₂).

Tabela 13 – Parâmetros de aquisição em MS/MS para o ometoato e Iões fragmento característicos.

Pesticida	Peso Molecular	Tempo de Retenção	Voltagem do cone (V)	Fragmentos MRM (m/z)	Energia de Colisão (eV)
				Ião precursor → Ião produto	
Ometoato	213,19	1,96 min	27	MRM ₁ m/z=214 → m/z=125	25
	Aquisição:	0,00-4,00 min		MRM ₂ m/z=214 → m/z=109	25

Os cromatogramas de corrente iônica total podem ser desdobrados para corresponder a cada um dos fragmentos MRM_1 e MRM_2 monitorizados (Figura 27), registrando a intensidade da resposta individual para oportunamente calcular a razão de intensidades característica (Capítulo 10 desta tese).

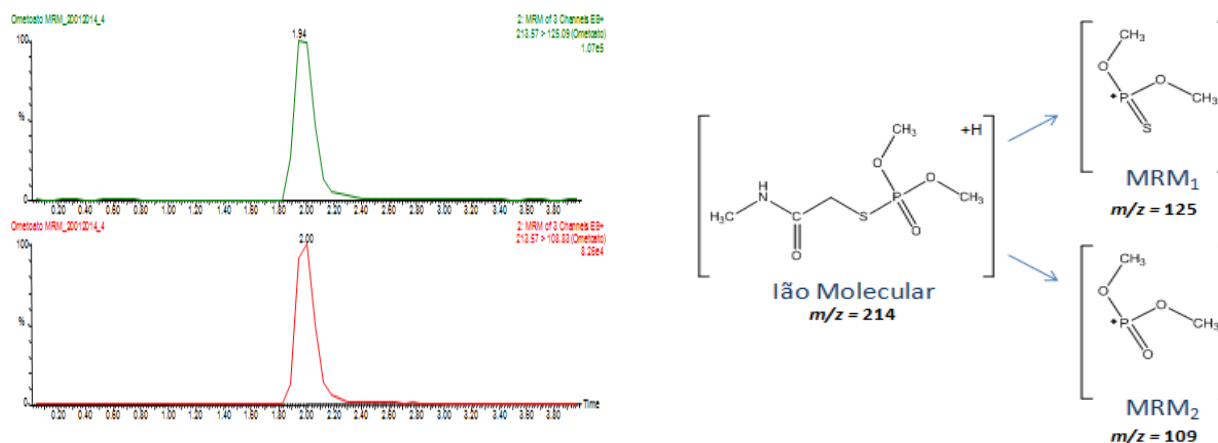


Figura 27 – Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS e estrutura molecular proposta para os íons fragmento do ometoato.

9.6.2.2 Acrilamida

Voltagem do cone

A otimização dos parâmetros de MS/MS foi inicialmente realizada através do ensaio de uma solução padrão individual 200µg/L de acrilamida preparada em fase móvel, e aquisição do espectro de massa quando se varia a voltagem do cone a intervalos regulares. A observação dos espectros permitiu inferir um tempo de retenção característico e as condições que determinam maior intensidade de sinal e sensibilidade para o íon molecular.

Os cromatogramas obtidos em SCAN e a aquisição da razão m/z correspondente ao íon molecular no modo seletivo de íons permitem proceder ao afinamento da voltagem do cone, estando representada na Figura 28 e Figura 29 a intensidade da resposta em função da voltagem aplicada:

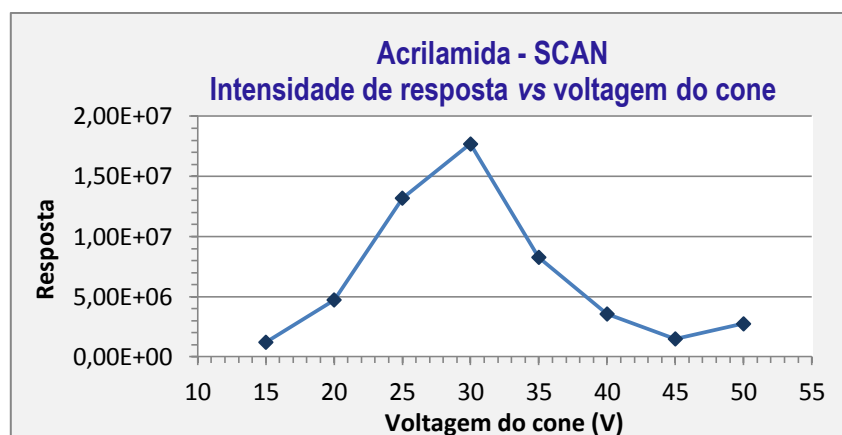


Figura 28 – Intensidade da resposta em função da voltagem do cone em modo SCAN de aquisição.

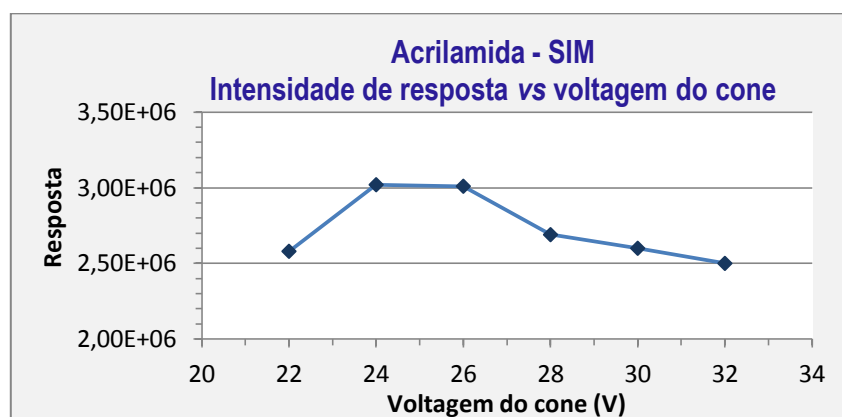


Figura 29 – Intensidade da resposta em função da voltagem do cone em modo SIM de aquisição.

Os cromatogramas adquiridos em modo SCAN foram avaliados e determinado um tempo de retenção médio $T_r = 1,85$ minutos, coerentemente com as características de solubilidade da acrilamida e informação investigada que fizeram prever um tempo de retenção curto. Esta condição foi responsável por definir o intervalo temporal entre os zero e os 4,00 minutos para a separação cromatográfica e monitorização de iões fragmento específicos. A análise do gráfico em SIM que relaciona a intensidade da resposta com a voltagem do cone conduziu à escolha de uma voltagem = 24 Volt.

Energia de Colisão: Estudo da fragmentação

A análise do espectro de massa foi realizada para investigar a fragmentação do ião molecular da acrilamida ($m/z = 72$) nos dois iões fragmento característicos, respetivamente $m/z = 55$ e $m/z = 44$ (Figura 30).

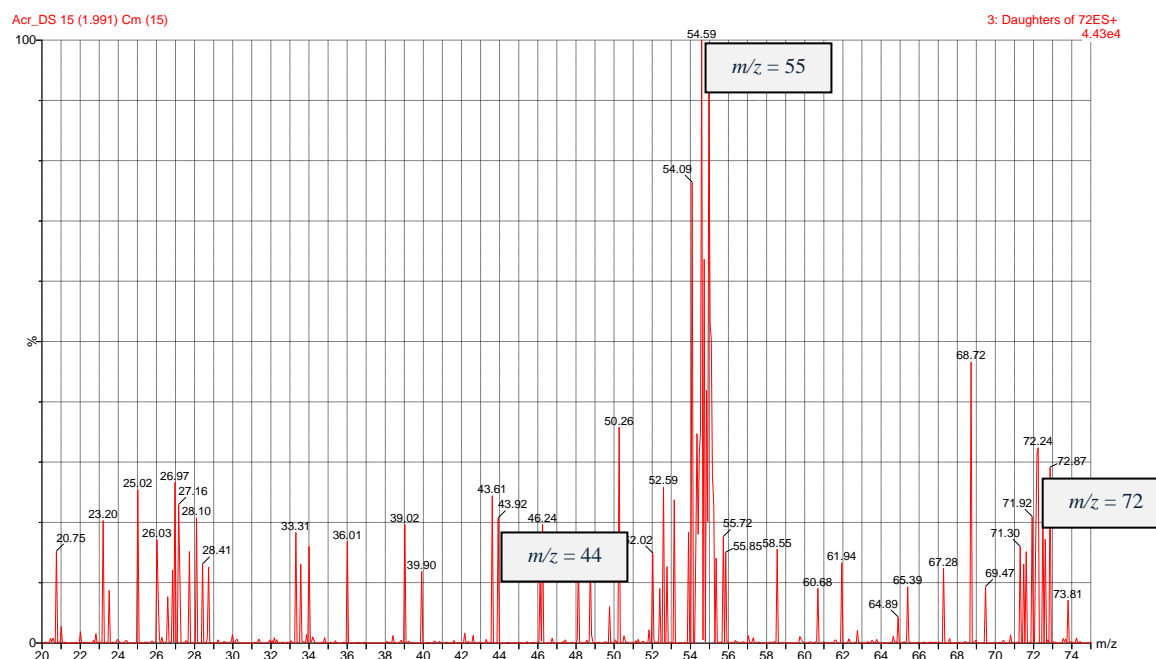


Figura 30 – Espectro de massa adquirido em modo DS para uma energia de colisão de 15eV.

A Tabela 14 e o gráfico de dupla entrada da Figura 31 permitem observar o decréscimo das intensidades do ião precursor e do fragmento MRM_1 quando se procede ao varrimento da energia de colisão, ocorrendo o incremento na resposta de MRM_2 e atingido um máximo para a energia de colisão = 15eV. A diminuição da intensidade de MRM_2 quando se aplicam energias mais elevadas indicia a decomposição deste ião fragmento.

Tabela 14 – Estudo da fragmentação: intensidades do ião precursor e iões fragmento, registadas em DS.

Energia de Colisão (eV)	Ião Pai ($m/z=72,01$)	MRM_1 ($m/z=55,01$)	MRM_2 ($m/z=43,66$)
5	4,55E+06	7,71E+05	1,51E+04
10	9,07E+05	7,83E+05	1,71E+04
15	6,23E+04	2,33E+05	2,03E+04
20	3,60E+04	4,14E+04	1,15E+04
25	3,80E+04	6,33E+04	1,20E+04
30	1,81E+04	3,25E+04	7,06E+03
35	1,29E+04	6,99E+04	3,86E+03
40	4,90E+04	5,15E+04	2,58E+03

A linha assinalada indica as intensidades do ião molecular e dos iões fragmentos seleccionados, correspondentes a uma abundância relativa de 100% para MRM_1 , 26,74% para o ião precursor e 8,71% para MRM_2 quando aplicada uma energia de colisão = 15eV.

As intensidades do íon precursor e dos fragmentos considerados foram agrupadas nos eixos do gráfico de acordo com a ordem de grandeza da respetiva resposta, de forma a permitir uma interpretação visual e elucidativa da prevalência dos íões selecionados em função da energia de colisão aplicada.

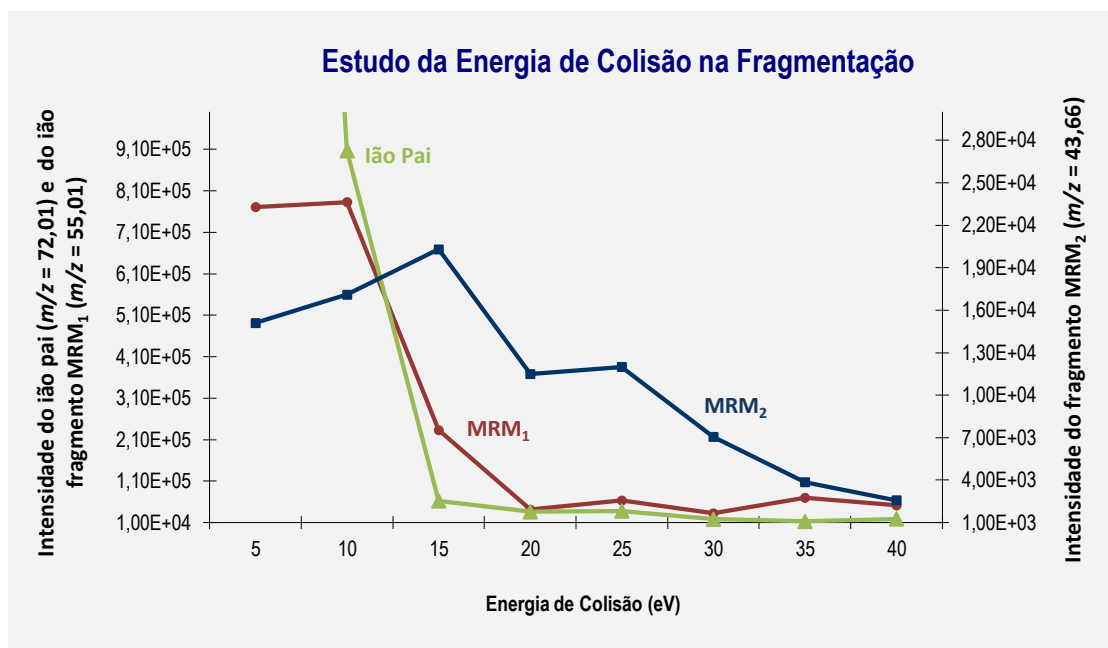


Figura 31 – Intensidade de resposta do íon molecular e íões fragmento adquiridos em DS, quando se procede ao varrimento da energia de colisão.

O ensaio dos íões selecionados em modo de monitorização de reação múltipla permite que estes sejam definidos como os fragmentos de quantificação (MRM₁) e confirmação da identidade (MRM₂), e avaliada a razão de intensidades [MRM₁/MRM₂] característica [13,55,61]. Conclusivamente, a energia de colisão a aplicar na análise de acrilamida foi estabelecida em 15eV, constituindo este valor a condição para que sejam observadas as duas razões m/z características.

Os parâmetros experimentais otimizados e os fragmentos monitorizados em MS/MS estão descritos na Tabela 15, especificamente a voltagem do cone, a energia de colisão, o tempo de retenção e os íões fragmento da acrilamida monitorizados.

Tabela 15 – Parâmetros de aquisição em MS/MS para a acrilamida e íões fragmento característicos.

Composto	Peso Molecular	Tempo de Retenção	Voltagem do cone (V)	Fragmentos MRM (m/z) Íão precursor → Íão produto	Energia de Colisão (eV)
Acrilamida	72,10	1,92 min	24	MRM ₁ $m/z=72 \rightarrow m/z=55$	15
	Aquisição:	0,00-4,00 min		MRM ₂ $m/z=72 \rightarrow m/z=44$	15

Os cromatogramas de corrente iônica total podem ser desdobrados para corresponder a cada um dos fragmentos MRM_1 e MRM_2 monitorizados (Figura 32), com a resposta individual a ser utilizada para tratamento dos resultados no ponto 10 desta tese.

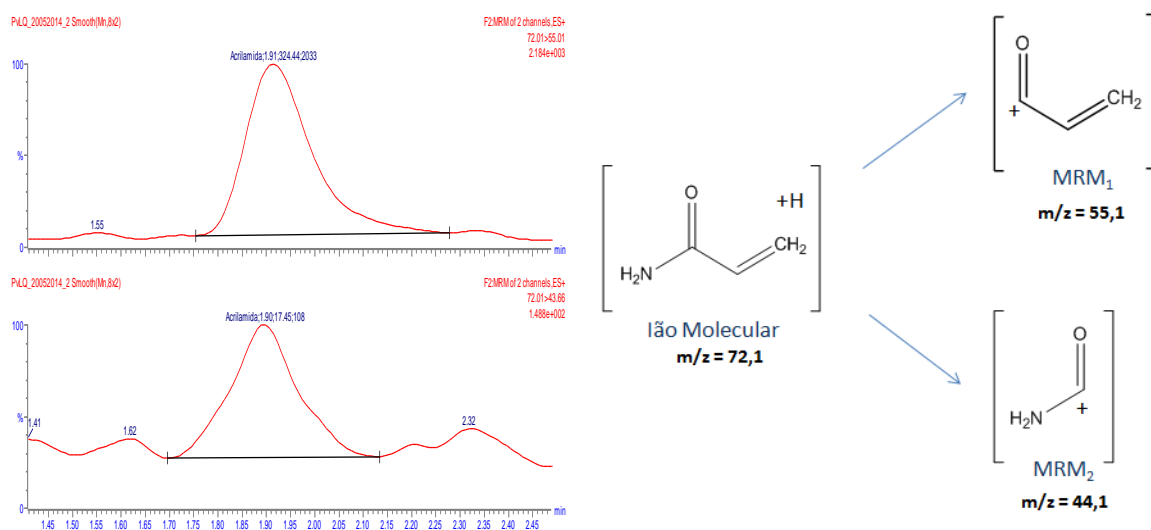


Figura 32 – Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS e estrutura molecular proposta para os íões fragmento da acrilamida.

10 Discussão dos resultados

10.1 Validação do método de ensaio

Os parâmetros a serem avaliados para a validação dos resultados dependem do objetivo qualitativo de detetar a presença ou ausência de determinada substância, ou da importância em quantificar o composto dentro dos limites legais estabelecidos [55]. No âmbito da aceitação dos resultados produzidos por uma metodologia quantitativa, os parâmetros a considerar deverão incluir aqueles relacionados com a capacidade da técnica em produzir uma resposta consistente, estável, reprodutível e inequívoca para um determinado. Deste modo, considerando que os parâmetros necessários para o rastreio ou confirmação da presença de uma substância estão integrados naqueles requeridos para análise quantitativa, uma metodologia de determinação assume igualmente validade para a deteção qualitativa.

A validação dos métodos de ensaio para determinação dos compostos em estudo segue as orientações e especificações descritas no guia de validação de métodos cromatográficos do laboratório, tendo em vista a sua implementação na rotina laboratorial de análise e os pedidos de aprovação para a acreditação dos resultados produzidos [55].

Na perspetiva de enquadramento dos requisitos de desempenho de métodos analíticos especificados no Decreto-Lei 306/2007, os limites definidos para a exatidão e precisão são apresentados como percentagem do valor paramétrico, assim como o limite de deteção que tem de ser atingido na análise de dado parâmetro [3]. Os critérios de desempenho de métodos de análise foram definidos como 25% do valor paramétrico para a exatidão, precisão e cálculo do limite de deteção, quando considerada a análise de cada pesticida individualmente. A legislação não especifica limites para as características de desempenho de métodos de análise para a acrilamida, não estando deste modo contemplados no decurso deste trabalho experimental [3].

No que respeita a implementação de métodos, assume importância referir que os critérios de aceitação considerados no processo de validação estão orientados para aqueles que se projetam estabelecer para os controlos do método praticado em rotina, sendo oportunamente referenciados em cada um dos pontos da discussão dos resultados.

10.1.1 Seletividade e identificação da entidade química

10.1.1.1 Tempo de Retenção

Nas condições de operação estudadas e definidas para o método analítico, o conhecimento do tempo de retenção característico de uma substância adquire importância quando se pretende inferir a sua presença numa amostra ou padrão analisados. O tempo de retenção (T_r) constitui deste modo o primeiro critério para a identificação da entidade molecular [55].

Os resultados de ensaio dos padrões preparados, extraídos e analisados permitem calcular um valor médio e estimar o T_r característico de um determinando, estando definido que em rotina o T_r dos picos obtidos para amostras reais deve ser comparado com aquele dos padrões de controlo analisados na mesma sessão de trabalho [55].

No decurso da rotina laboratorial podem ocorrer flutuações do T_r , causadas por fatores como o desgaste normal decorrente do uso da coluna. De acordo com o guia de validação de métodos cromatográficos do laboratório, o critério de aceitação para o parâmetro T_r quando se analisam amostras reais estabelece uma amplitude de variação de $\pm 0,30$ minutos, comparativamente ao valor T_r característico. Este parâmetro deve ser reajustado à medida que se adquire um maior e mais representativo número de resultados, decorrentes da análise dos padrões e amostras fortificadas preparados no decurso das análises em rotina [55].

Na Tabela 16 estão apresentados o tempo de retenção médio e a amplitude de variação deste parâmetro para o ometoato e acrilamida, calculados a partir dos resultados experimentais dos padrões e amostras fortificadas analisados durante o processo de validação e no decurso da execução do método.

Tabela 16 - Tempo de retenção característico e amplitude de variação experimental.

Determinando	$T_{r_{\text{médio}}}$ (min)	Amplitude de variação (min)	Número de ensaios
Ometoato	1,96	0,08	$n = 9$
Acrilamida	1,91	0,12	$n = 7$

10.1.1.2 Monitorização de iões fragmento específicos

Em espectrometria de massa *tandem* a identificação inequívoca de uma substância vai ser suportada pela observação dos fragmentos de quantificação [MRM₁] e confirmação [MRM₂], monitorizados nas condições específicas de operação do analisador TQ, considerando o valor característico da razão [MRM₁/MRM₂] para o determinando, de acordo com a expressão [13,55,61]:

$$\left[\frac{MRM_1}{MRM_2} \right] = \frac{\text{Altura Pico } MRM_1}{\text{Altura Pico } MRM_2}$$

A determinação da razão entre as intensidades deve ser feita para os níveis de concentração estudados, de modo a ser definido um valor característico que permita a aceitação dos resultados quando se executa o método em rotina, e se analisam amostras desconhecidas potencialmente contaminadas com ometoato ou acrilamida [55]. A confirmação da identidade com base na razão dos fragmentos monitorizados vai depender do cumprimento do critério estabelecido, definido como [MRM₁/MRM₂]_{médio} ± coeficiente de variação aceite (25%) [55,98].

Em conjunto, a verificação do parâmetro tempo de retenção e a monitorização dos iões fragmento selecionados, quantificáveis e com uma razão de intensidades característica, constituem os filtros para que seja inferida a identidade dos analitos [55].

Em resumo, os critérios constituídos para identificação do composto são:

- O desvio entre os tempos de retenção de amostra e padrão de controlo analisados não deverá exceder os 0,30 minutos.
- A altura do pico correspondente ao composto apresenta uma razão sinal/ruído superior a 3.
- Apresenta nos cromatogramas os fragmentos de quantificação e confirmação, não podendo a razão [MRM₁/MRM₂] exceder os 25%, relativamente ao valor característico para o determinando.

A razão característica entre as intensidades dos fragmentos foi determinada em simultâneo com o traçado da curva de calibração, com o cálculo a ser realizado para cada nível de concentração considerado.

Pesticida ometoato

Podem ser observados no gráfico de dupla entrada da Figura 33 os pontos correspondentes ao valor da razão $[MRM_1/MRM_2]$ para cada padrão de calibração. Deste modo, a confirmação da identidade com base no rácio das transições vai estar dependente do cumprimento do critério de aceitação, com referência ao intervalo $[MRM_1/MRM_2] = 1,11 \pm 25\%$.

A razão $[MRM_1/MRM_2]$ determinada para cada ponto de calibração apresentou valores estáveis em toda a amplitude da gama linear, com um desvio padrão relativo calculado de 9,20%, o que permite atestar que este parâmetro de confirmação poderá ser utilizado em rotina com um elevado grau de confiança [98].

Foi observado o cumprimento deste critério de identificação para os padrões e amostras fortificadas analisados no decurso do trabalho experimental.

Acrilamida

A razão das intensidades $[MRM_1/MRM_2]$ a cada nível (Figura 34) apresenta estabilidade ao longo da gama linear, com o intervalo de aceitação a ser definido como $[MRM_1/MRM_2] = 20,91 \pm 25\%$ e o desvio padrão relativo calculado 10,71% a atestar a validade deste parâmetro para a confirmação da identidade do determinando [98]. O cumprimento deste critério para os padrões e amostras fortificadas analisados permitiu a confirmação da identidade por recurso a este parâmetro.

10.1.2 Calibração da resposta

Pesticida ometoato

A análise de padrões de concentração crescente foi realizada para construir curvas de calibração, sendo para o efeito preparados e extraídos padrões a seis níveis de concentração, correspondentes a uma gama de trabalho entre 0,014µg/L e 0,064µg/L. Os padrões de calibração são preparados por fortificação de 500mL de água desmineralizada (*Milli-Q®*) com volumes medidos de uma solução padrão de calibração, estando a concentração final dos extratos reconstituídos afetada de um fator de

concentração de 1000x. A observar que a construção da curva de calibração deve ser realizada em cada sessão de trabalho no decurso do processo de validação.

Os níveis de concentração foram equitativamente distribuídos ao longo da amplitude do intervalo de calibração, e estabelecida a correlação entre a intensidade de sinal no cromatograma de corrente iónica total e o valor de concentração do padrão correspondente (Figura 33).

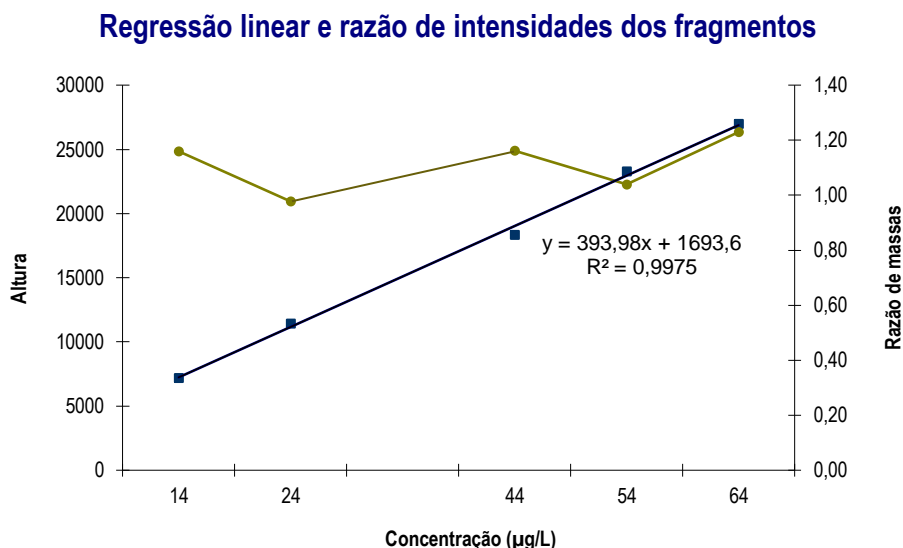


Figura 33 – Curva de calibração e razão entre as intensidades dos fragmentos monitorizados. Os níveis de concentração estão representados a azul, e a razão de intensidades dos fragmentos com a cor verde.

A regressão linear foi traçada com recurso ao método dos mínimos quadrados, tendo eliminado o padrão de concentração 0,034µg/L para que fosse cumprido o requisito referente ao valor do coeficiente de determinação, estando estabelecido que deve ser atendida a condição $R^2 > 0,995$. O número mínimo de pontos a utilizar para a construção da curva de calibração consta do guia de validação do laboratório, estando definido um $N \geq 5$ [98].

Acrilamida

A calibração do sistema foi realizada por análise dos padrões de calibração preparados diretamente em fase móvel, para um intervalo de concentrações entre 50µg/L e 150µg/L. Os níveis de concentração foram equitativamente espaçados dentro da gama de trabalho, com a curva que relaciona a resposta instrumental com a concentração do

padrão a ser utilizada para o cálculo dos parâmetros de validação da regressão (Figura 34). Assume importância notar que os níveis de calibração correspondem a uma concentração de 500x do intervalo de concentrações entre 0,10µg/L e 0,30µg/L, gama de trabalho definida para o método.

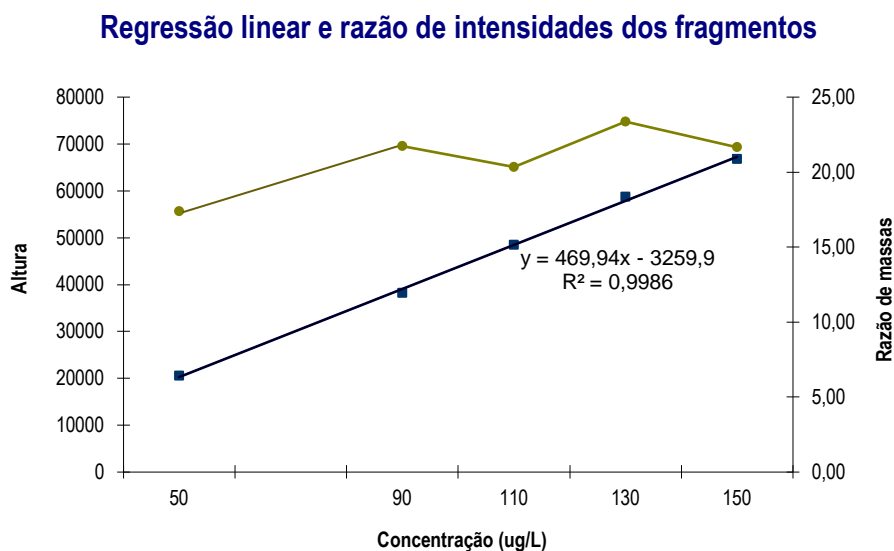


Figura 34 – Curva de calibração e razão entre as intensidades dos fragmentos monitorizados. Os níveis de concentração estão representados a azul, e a razão de intensidades dos fragmentos com a cor verde.

A regressão linear foi traçada com $N = 5$ pontos, e obtido o valor de $R^2 = 0,9986$ para o coeficiente de determinação, cumprindo os requisitos estabelecidos para a aceitação da curva.

10.1.3 Linearidade e parâmetros da regressão linear

O ajuste dos pontos experimentais ao modelo de calibração é avaliado através de parâmetros da regressão linear e realização de testes estatísticos, os quais permitem investigar a linearidade da resposta dentro da gama de trabalho estudada [98]:

Coeficiente de determinação (R^2)

A equação de regressão linear tem de apresentar um valor de coeficiente de determinação não inferior a 0,995 para um nível de confiança de 95%, condição verificada para as curvas de calibração construídas no decurso do trabalho experimental. No entanto, a maior aproximação de R^2 da unidade para a regressão quadrática não

significa que essa represente o melhor modelo, tendo de ser realizados o teste estatístico e apreciado o valor de R^2_{ajustado} , constituindo este um indicador de qual o tipo de polinómio que produz o melhor ajuste aos pontos experimentais [1,98].

Teste de *Mandel*

O *Microsoft Excel*® foi utilizado para calcular o desvio padrão residual das regressões linear e quadrática, permitindo a aplicação destes parâmetros na fórmula de cálculo da designada diferença de variâncias (DS^2).

$$\left. \begin{aligned} S_{y1} &= \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{N-2}} \\ S_{y2} &= \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_{i2})^2}{N-3}} \end{aligned} \right\} \begin{aligned} DS^2 &= (N-2) \times S_{y1}^2 - (N-3) \times S_{y2}^2 \\ PG &= \frac{DS^2}{S_{y2}^2} \end{aligned}$$

Tabela 17 – Teste estatístico de *Mandel* e R^2_{ajustado} na calibração realizada para o ometoato.

Ometoato		
$PG =$	0,3357	
$F (Fischer) =$	19,16	($N-2$) e ($N-3$) graus de liberdade
$R^2_{\text{ajustado}} =$	0,9967	<i>Linear</i>
	0,9958	<i>Quadrática</i>

Tabela 18 - Teste estatístico de *Mandel* e R^2_{ajustado} na calibração realizada para a acrilamida.

Acrilamida		
$PG =$	0,0326	
$F (Fischer) =$	19,16	($N-2$) e ($N-3$) graus de liberdade
$R^2_{\text{ajustado}} =$	0,9982	<i>Linear</i>
	0,9973	<i>Quadrática</i>

A determinação do índice PG e a sua comparação com o F tabelado na distribuição de *Fischer* permitem inferir qual dos modelos corresponde a um melhor ajuste dos pontos experimentais (se $PG < F$ o modelo linear é o escolhido) [98,106].

Conforme apresentado na Tabela 17 e Tabela 18, a verificação de R^2_{ajustado} mais elevado e de um valor teste PG inferior a $F_{\text{crítico}}$ nas curvas de calibração construídas para ambos os compostos evidenciam o ajuste do modelo linear.

Teste de *Rikilt*

O cálculo percentual da razão entre a resposta instrumental e a concentração do padrão para cada ponto de calibração cumprem com o critério admitido de 20%, quando relacionados com o valor médio da razão, calculado para os pontos de calibração considerados (Tabela 19).

$$\text{Valor teste} = \frac{y_i/x_i}{(\bar{y_i/x_i})_{\text{médio}}} \times 100$$

Tabela 19 – Valores teste de *Rikilt* para cada um dos pontos experimentais de calibração, para os compostos ometoato e acrilamida.

Valor teste percentual		
Padrão de calibração	Ometoato	Acrilamida
P1	113,61	94,48
P2	105,38	-
P3	-	97,68
P4	92,25	101,40
P5	95,43	103,97
P6	93,33	102,47

Critério de aceitação: 80 -120%

Análise de resíduos

A dispersão aleatória do desvio dos pontos experimentais ao modelo evidencia a linearidade da resposta [1], estando apresentados na Figura 35 os gráficos de dispersão dos resíduos para o ometoato e acrilamida, construídos a partir dos valores experimentais e respetivos modelos. Os resíduos considerados individualmente não devem exceder o valor máximo permitido de 20%, condição definida no guia de validação de métodos cromatográficos do laboratório [98].

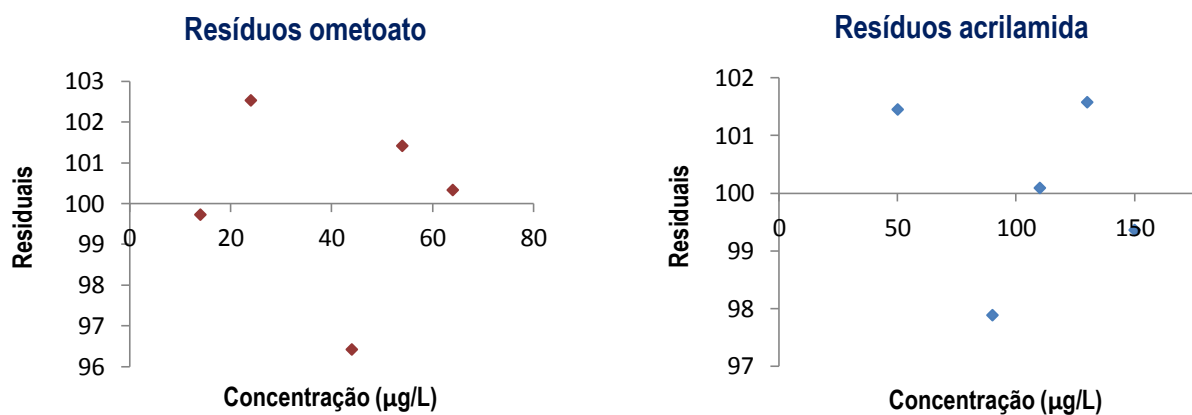


Figura 35 – Gráficos de dispersão do valor percentual dos resíduos para o ometoato e acrilamida.

Sensibilidade

O parâmetro sensibilidade é calculado entre os dois pontos extremos da gama de trabalho, através da expressão:

$$S = \Delta y / \Delta c$$

Este parâmetro corresponde a um valor próximo do declive da regressão linear, respetivamente 396,18 para o ometoato e 462,72 para a acrilamida, estimados a partir das calibrações da Figura 33 e Figura 34 [98,106].

Na Tabela 20 e Tabela 21 estão apresentados os parâmetros de validação da regressão linear, assim como os limiares analíticos teóricos e o valor médio da razão $[MRM_1/MRM_2]$ determinados para os dois compostos.

Os limites de deteção e quantificação foram calculados a partir dos parâmetros da curva de calibração, por aplicação de um fator multiplicativo ao desvio padrão residual da regressão linear, e dividido este produto pelo declive [1,98].

Tabela 20 - Parâmetros de validação estudados para o pesticida ometoato.

Composto	Gama Linear (µg/L)	Coefficiente de determinação (R ²)	Número de Padrões (N)	Limiares analíticos instrumentais (µg/L)		Razão $[MRM_1/MRM_2]$ (%RSD)	Teste de Mandel	
				LD	LQ			
Ometoato	14-64	0,9975	5	3,57	11,89	1,11 (9,20%)	$F(3,2) 95\% = 19,16$	PG=0,3357

Tabela 21 - Parâmetros de validação estudados para a acrilamida.

Composto	Gama Linear (µg/L)	Coeficiente de determinação (R ²)	Número de Padrões (N)	Limitares analíticos instrumentais (µg/L)		Razão [MRM ₁ /MRM ₂] (%RSD)	Teste de <i>Mandel</i>	
				LD	LQ			
Acrilamida	50-150	0,9986	5	4,92	16,41	20,91 (10,71%)	<i>F</i> (3,2) 95% = 19,16	PG=0,0326

O limite de quantificação do método corresponderá portanto à razão entre a concentração do padrão mais baixo da gama linear e o fator de concentração obtido para o extrato, respetivamente 1000x para o ometoato e 500x para a acrilamida, podendo o valor de concentração das amostras reais ser corrigido pela percentagem de recuperação média para dada matriz, estudada em condições de precisão intermédia [55]. A observar que os resultados expressos devem ter no mínimo o mesmo número de casas decimais que o valor especificado para cada parâmetro no decreto 306/2007, diploma legal que regulamenta o controlo e especificações da água para consumo humano [3].

O estabelecimento do limite de quantificação ao nível de 0,014µg/L viabiliza o desempenho do método para a determinação de níveis vestigiais de pesticida, cumprindo o requisito legal definido como 25% do valor paramétrico para o limite de deteção na análise desta classe de compostos. O LD inferior a 0,025µg/L e o LQ inferior a 0,075µg/L permitirão a quantificação de ometoato para valores de concentração inferiores ao valor paramétrico.

No método analítico para a determinação de acrilamida o limite de quantificação foi estabelecido ao nível do valor paramétrico legalmente instituído (0,10µg/L).

10.1.4 Repetibilidade

10.1.4.1 Pesticida ometoato

O estudo da repetibilidade do método compreendeu a realização de 10 ensaios independentes dos padrões em água desmineralizada e de amostras reais de matriz fortificada, preparados ao nível do limite de quantificação e a um nível intermédio de concentração. O efeito de matriz na precisão dos resultados foi avaliado por análise de amostras fortificadas de água de consumo humano e de água natural, em bruto e após

filtração para a matriz não tratada, com referência a que a filtração foi realizada após dopagem das amostras e apenas ao nível de controlo para o pesticida ometoato. Os padrões e amostras fortificadas são processados e analisados pelo método de ensaio, com a resposta instrumental a ser interpolada em curva de calibração construída pontualmente com padrões extraídos.

A repetibilidade ou precisão dentro da sessão de trabalho pode ser expressa em termos de coeficiente de variação (desvio padrão relativo), determinado por tratamento dos resultados experimentais de dez ensaios independentes realizados aos níveis de concentração estudados, considerando um número mínimo representativo de $n=6$ ensaios. Para a validação do limite de quantificação existe o requisito de o resultado de concentração média se encontrar dentro do limite percentual de 20% relativamente ao valor teórico de *spiking*. Os valores experimentais foram utilizados para calcular os valores médios de concentração e o desvio padrão dos conjuntos de resultados, com o coeficiente de variação a ser calculado pela expressão descrita como $\%RSD = SD/\bar{x}$. O critério de aceitação constituído para o coeficiente de variação foi igualmente estabelecido em 20%, de acordo com o guia de validação de métodos cromatográficos do laboratório [98]. O erro relativo traduz o desvio percentual da concentração média relativamente ao valor teórico assumido como verdadeiro para os padrões preparados ou amostras fortificadas [98].

Os parâmetros de repetibilidade para os padrões em água desmineralizada e amostras fortificadas aos níveis de concentração estudados estão apresentados na Tabela 22 e Tabela 23:

Tabela 22 – Estudo da repetibilidade ao nível do limite de quantificação (0,014 µg/L).

	Água desmineralizada	Água de consumo humano	Água natural (Não filtrada)
Média (concentração µg/L)	0,0132	0,0143	0,0160
Desvio padrão	1,51E-03	2,39E-03	1,06E-03
Coeficiente de variação (%RSD)	11,40	16,70	6,62
Erro relativo (%)	-5,71	2,14	13,93
Critério de aceitação: $\%RSD \leq 20$			($n=6$)

Tabela 23 – Estudo da repetibilidade a um nível superior de controlo: 0,040 µg/L em água desmineralizada e água de consumo humano; fortificação de água natural a 0,024 µg/L (não filtrada) e 0,040 µg/L (filtrada).

	Água desmineralizada	Água de consumo humano	Água natural (Não filtrada)	Água natural (Filtrada)
Concentração Média (µg/L)	0,0372	0,0372	0,0260	0,0344
Desvio padrão	4,39E-03	4,32E-03	2,91E-03	1,47E-03
Coefficiente de variação (%RSD)	11,80	11,60	11,23	4,28
Erro relativo (%)	-7,00	-7,00	8,13	-14,05
	(n=8)	(n=7)	(n=10)	(n=6)

Critério de aceitação: %RSD ≤ 20

10.1.4.2 Acrilamida

O estudo da repetibilidade do método compreendeu a realização de 10 ensaios independentes dos padrões preparados em água desmineralizada e de amostras reais de matriz fortificada, preparados ao nível do limite de quantificação e a um nível intermédio de concentração. O efeito de matriz na precisão dos resultados foi avaliado por análise de amostras fortificadas de água de consumo humano, com a resposta instrumental a ser convertida em concentração por cálculo através de um fator de resposta. O procedimento de rotina recorre a padrões extraídos para determinar um fator de resposta utilizado no cálculo das concentrações, sendo este oportunamente descrito e esclarecido no ponto 10.2 desta tese [98,114].

A repetibilidade é expressa em termos de coeficiente de variação, calculada a partir do tratamento dos resultados experimentais dos ensaios independentes realizados aos dois níveis de concentração especificados, e considerado para o cálculo um número mínimo representativo de $n=6$ ensaios [98].

O coeficiente de variação, definido como o quociente entre o desvio padrão e a concentração média, tem de cumprir o critério estabelecido em %RSD ≤ 20 no guia de validação de métodos cromatográficos. Em termos de repetibilidade, o desvio padrão define a dispersão observada para os valores experimentais, enquanto o erro relativo descreve o desvio da média dos resultados em relação ao valor teórico assumido como verdadeiro.

Os parâmetros de repetibilidade calculados para os padrões em água desmineralizada e amostras fortificadas, preparados aos dois níveis de concentração considerados, são apresentados na Tabela 24 e Tabela 25:

Tabela 24 – Estudo da repetibilidade ao nível do limite de quantificação (0,10 µg/L).

	Água desmineralizada	Água de consumo humano
Média (concentração µg/L)	0,0863	0,0935
Desvio padrão	1,46E-02	9,66E-03
Coefficiente de variação (%RSD)	16,94	9,40
Erro relativo (%)	-13,67	-6,47
Critério de aceitação: %RSD ≤ 20		(n=6)

Tabela 25 – Estudo da repetibilidade ao nível do padrão de controlo (0,16 µg/L).

	Água desmineralizada	Água de consumo humano
Média (concentração µg/L)	0,169	0,148
Desvio padrão	1,73E-02	2,30E-02
Coefficiente de variação (%RSD)	10,21	15,52
Erro relativo (%)	5,67	-7,40
	(n=8)	(n=6)

Critério de aceitação: %RSD ≤ 20

10.1.5 Modelo de calibração e homocedasticidade

O estudo da homogeneidade de variâncias está contemplado no guia de validação de métodos cromatográficos com o objetivo de validar o modelo de calibração aplicado. Tomando em consideração o coeficiente de determinação como o parâmetro de ajuste, valores muito próximos da unidade não implicam obrigatoriamente que a regressão linear simples se apresente como a mais adequada, uma vez que no método dos mínimos quadrados ocorre a redução dos resíduos (desvios dos pontos experimentais ao modelo) para valores de concentração mais elevados, determinando a sua influência na minimização da dita soma [115]. Esta condicionante adquire particular importância quando a gama de trabalho se apresenta bastante alargada, em que para concentrações muito pequenas os desvios experimentais relativamente à curva não são devidamente ponderados, existindo para estes casos modelos de calibração adequados. Atendendo

especificamente na natureza e proveniência das amostras em estudo, não se mostra expectável a necessidade de uma gama de trabalho ampla para a análise de águas de consumo.

Idealmente ambiciona-se a simplicidade do modelo, havendo a considerar que um requisito exigido para a calibração linear simples é a sua aplicação a um intervalo de concentrações que apresente variabilidade comparável, ou seja, a homocedasticidade ou homogeneidade das variâncias [102].

As recomendações da norma ISO-8466-1 e as orientações do guia RELACRE 13 sugerem a realização do teste estatístico de PG entre os níveis de menor e maior concentração da curva de calibração [106]. No entanto, para cumprimento dos requisitos constantes do guia de validação de métodos cromatográficos do laboratório, a homocedasticidade foi avaliada entre o LQ e um nível intermédio de concentração, considerados para o efeito os ensaios realizados em condições de repetibilidade, por não serem expectáveis níveis quantificáveis para este parâmetro [98].

O valor PG corresponde ao quociente entre as variâncias observadas para os dois níveis de concentração, estando definido que o seu valor tem de ser igual ou superior a 1 [98,106]:

$$PG = \frac{S_{sup}^2}{S_{inf}^2} \quad \text{ou} \quad PG = \frac{S_{inf}^2}{S_{sup}^2} \quad \text{tal que } PG \geq 1$$

Os elementos da fração correspondem à variância nos pontos inferior e superior de concentração, sendo o valor encontrado para PG comparado com o valor de F tabelado na distribuição de *Fisher/Snedecor*, e determinado que se verifica a homogeneidade das variâncias quando o valor de PG é inferior ao $F_{crítico}$ [98,106].

A inexistência de diferença significativa entre as variâncias calculadas para os níveis de concentração estudados em condições de repetibilidade pode ser observada nas Tabelas 26 e 27, onde se compara o valor teste PG com o F tabelado para $(n-1)$ graus de liberdade no numerador e denominador. Os resultados apresentados para o ometoato e acrilamida indicam que, pelo menos entre estes dois pontos, a calibração não requer um procedimento particular de ponderação e a atribuição de maior peso/importância aos pontos experimentais com menor variância, correspondentes frequentemente ao nível mais baixo de concentração [115].

Tabela 26 - Estudo da homocedasticidade entre os dois níveis de concentração para o ometoato, realizado em condições de repetibilidade.

	Nível PvLQ (0,014 µg/L)	Nível PC (0,040 µg/L)
Variância	2,69E-06	1,21E-05
PG =	4,52	
F (Fischer) =	5,05	com 5 graus de liberdade no numerador e denominador
	(n=6)	(n=6)

Tabela 27 - Estudo da homocedasticidade entre os dois níveis de concentração para a acrilamida, realizado em condições de repetibilidade.

	Nível PvLQ (0,100 µg/L)	Nível PC (0,160 µg/L)
Variância	2,14E-04	2,98E-04
PG =	1,39	
F (Fischer) =	4,88	com 7 graus de liberdade no numerador e 5 no denominador
	(n=6)	(n=8)

Os resultados encontrados para n replicados dos padrões preparados em água desmineralizada mostram que as variâncias não são significativamente diferentes dentro do intervalo de concentrações estudado, com $(n-1)$ graus de liberdade no numerador e denominador [116]. A verificação da homogeneidade de variâncias entre os dois pontos da curva permite que a regressão linear simples seja utilizada para estabelecer a correlação entre a concentração do determinando e a resposta instrumental [102].

10.1.6 Ensaios de Recuperação

Os ensaios de recuperação consistem na análise de matrizes reais fortificadas com o determinando. Neste trabalho experimental, o estudo da recuperação compreende a análise de amostras fortificadas de água natural e de água de consumo (em alternativa pode fortificar-se uma alíquota de água da torneira adicionada de solução conservante, quando não exista amostra de água de consumo em quantidade suficiente) para o pesticida ometoato, e exclusivamente em água de consumo para a acrilamida. A amostra fortificada é processada de acordo com as técnicas de extração, separação cromatográfica e detecção por espectrometria de massa, tendo o potencial de averiguar a presença de componentes da matriz ou interferentes existentes na amostra a afetarem o

comportamento do método, nas condições definidas e otimizadas aquando do estudo com soluções padrão cuidadosamente preparadas e controladas. O efeito de matriz pode condicionar a quantidade recuperada na extração, por competição de constituintes da amostra para a fase estacionária de SPE, ou inclusivamente introduzir artefactos co-eluídos, pelo que as recuperações obtidas para cada analito e tipo de matriz são consideradas na estimativa da exatidão do método [55,98,102,106].

A percentagem de recuperação é calculada de acordo com a expressão [98]:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{Conc_{amostra \text{ fortificada}} - Conc_{amostra}}{Conc_{fortificação}} \times 100$$

Efeito de matriz

Pesticidas – Ometoato

Os resultados de ensaio da recuperação obtida para as amostras fortificadas aquando do estudo da repetibilidade foram considerados para estimar a recuperação média do determinando em água de consumo humano e em águas naturais. A percentagem recuperada foi avaliada aos dois níveis de concentração estudados, com a variável acrescida de a amostra fortificada de água natural ser submetida a filtração dos sólidos suspensos, num estudo realizado ao nível do padrão de controlo.

A componente de exatidão do método foi deste modo estimada como o valor de recuperação média obtido a partir do ensaio independente das amostras fortificadas, considerados os dois níveis de concentração estudados [106,112]:

$$\bar{R}_m = \frac{\bar{C}_{amostra \text{ fortificada}} - \bar{C}_{amostra}}{C_{fortificação}}$$

A recuperação média e o erro relativo transmitem a mesma informação em termos de exatidão da análise, ao expressarem o desvio dos resultados experimentais relativamente ao valor teórico ou de fortificação. Apesar da redundância, o efeito de matriz na recuperação do analito é comumente expresso como percentagem de recuperação, pelo que estão apresentados nas Tabelas 28 e 29 os resultados de recuperação média obtidos para o ometoato em condições de repetibilidade, em amostras fortificadas de água de

consumo humano e águas naturais respetivamente, considerado o número mínimo de $n = 6$ ensaios:

Tabela 28 – Recuperação média do ometoato em água de consumo humano, aos dois níveis de concentração estudados.

	Nível PvLQ (0,014 µg/L)	Nível PC (0,040 µg/L)
Recuperação média (%)	102,14	93,00
	($n=6$)	($n=7$)

Critério de aceitação: 75 -125 %

Tabela 29 - Recuperação média do ometoato em água natural, aos três níveis de concentração estudados, e parâmetros físico-químicos determinados.

	Nível PvLQ (0,014 µg/L)	Nível P2 (0,024 µg/L)	Nível PC (0,040 µg/L)
Recuperação média (%R_m)	113,93	108,13	85,95
	($n=6$)	($n=10$)	($n=6$)

Critério de aceitação: 75 -125 %

Parâmetros físico químicos

pH 7,20 à temperatura de 20,8°C

Condutividade 308 µS/cm

Sólidos suspensos totais 47,4 mg/L

As amostras fortificadas de água natural ao nível PC=0,040µg/L foram submetidas ao processo de filtração dos sólidos suspensos totais, previamente à análise.

As amostras de águas naturais podem conter sólidos suspensos e substâncias minerais ou orgânicas dissolvidas, as quais têm o potencial de adsorver/capturar os compostos e afetar a sua determinação [117]. A remoção dos sólidos suspensos totais foi feita por filtração da amostra fortificada, previamente à análise, com o objetivo de investigar se os níveis de sólidos existentes comprometem a recuperação e exatidão na determinação dos analitos. A existência de teores de partículas suspensas e sólidos dissolvidos pode colmatar os cartuchos de SPE e comprometer a etapa de extração, ao interferir com o normal carregamento da amostra e dificultar a secagem completa da fase estacionária, ocorrendo o arrastamento de água para o extrato na etapa de eluição. Em alguns dos

ensaios realizados, a presença de significativa quantidade de água no extrato dificultou a evaporação à secura e a posterior reconstituição em volume rigorosamente medido.

Apesar de as características de solubilidade do ometoato e o baixo valor de $\log K_d$ fazerem prever a sua mobilização a partir de particulados da amostra e a disponibilidade do composto em solução aquosa, foram observadas diferenças na quantidade recuperada para as amostras filtradas e não filtradas [36,117]. Com base nestes resultados, pode ser proposto que a filtração do elevado teor de sólidos da amostra afeta negativamente a recuperação do ometoato, ou alternativamente, componentes da matriz não filtrada são co-eluídos no processo de extração e responsáveis por induzir um incremento na resposta. Adquire importância considerar o cariz dos resultados adquiridos em condições de repetibilidade, os quais devem ser encarados com cautela quando se pretende obter informações conclusivas. Para uma maior representatividade e valor dos resultados experimentais deveriam ser realizadas análises em condições de precisão intermédia, em que variariam fatores como a amostra e outros parâmetros técnicos ou ambientais, para avaliar o efeito dos sólidos da amostra e dos filtros de celulose na recuperação do analito.

Com foco nos resultados das amostras de água natural não filtradas, a percentagem de recuperação constitui o principal parâmetro a considerar para avaliar os efeitos de matriz [56].

Pode ser referido como aspeto técnico que em águas de consumo a realização das análises sobre matrizes relativamente limpas reduz grandemente a deposição de contaminantes e resíduos na coluna e equipamento, contribuindo para um maior tempo de vida dos componentes instrumentais.

Os parâmetros pH, condutividade e teor de sólidos suspensos na amostra composta de água natural encontram-se apresentados na Tabela 29. Os valores de pH e condutividade da amostra composta de água natural indicam que estes parâmetros físico-químicos se apresentam equivalentes aos encontrados comumente em águas destinadas ao consumo humano, não se assumindo deste modo expectável a afetação do desempenho do método para águas naturais por estes fatores, os quais potencialmente influenciam o equilíbrio ácido base e as espécies químicas em solução [118].

Acrilamida

O ensaio de amostras fortificadas realizado em condições de repetibilidade permitiu avaliar a recuperação da acrilamida para a matriz em estudo. Encontra-se apresentada na Tabela 30 a recuperação média calculada para a acrilamida, considerados os resultados de um número mínimo de $n=6$ ensaios independentes de amostras de água de consumo, fortificadas ao nível do LQ e a um nível intermédio da gama de trabalho.

Tabela 30 – Recuperação média da acrilamida em água de consumo humano, aos dois níveis de concentração estudados.

	Nível PvLQ (0,10 µg/L)	Nível PC (0,16 µg/L)
Recuperação média (%R_m)	93,50	89,60
	($n=6$)	($n=7$)

Critério de aceitação: 75 -125 %

No que respeita o processo de validação, pode explicitar-se que a avaliação dos parâmetros descritos do guia de validação e o cumprimento dos critérios estabelecidos constituem os requisitos para a implementação de um método analítico.

10.2 Análise Quantitativa em Rotina

Validação de resultados e controlo de qualidade do método

A implementação de um método analítico na prática laboratorial exige o desempenho dos procedimentos de controlo da qualidade que determinam a aceitação e validação dos resultados produzidos, corroborando a fiabilidade e confiança na informação a emitir em boletim de análise.

Os ensaios a realizar devem avaliar a pureza dos reagentes e a introdução de interferentes no decurso do desempenho do método, os quais podem comprometer a resposta instrumental, enquanto a validação da calibração e o cumprimento dos critérios especificados para os padrões de controlo são fundamentais para a aceitação dos resultados analíticos [55].

A verificação inicial das condições passa pela análise de um branco direto, constituído por fase móvel (fase A no método para o ometoato, e água-metanol 60:40 (v/v) para a acrilamida), e análise de um branco com extração. O cromatograma de LC-MS/MS

registado para o ensaio em branco não deve apresentar qualquer pico detetável (altura igual ou superior ao LD) para o tempo de retenção do analito, sendo que a observação de sinal evidencia a existência de anomalias ou interferentes [55].

10.2.1 Validação da calibração por fator de resposta

O fator de resposta exprime uma relação entre a concentração do padrão de calibração e a intensidade de sinal/altura de pico correspondente, considerada a prévia validação da resposta linear do sistema. O cálculo é realizado através da expressão [55]:

$$Fr = \frac{\text{Concentração Padrão extraído}}{\text{Altura Pico}}$$

A quantificação do determinando por aplicação de um fator de resposta requer a aceitação do controlo de qualidade estipulado para o método.

Em rotina, para efeito de validação da calibração deverão ser obtidos resultados concordantes para pelo menos três padrões fator de resposta com concentração ao nível do LQ, preparados por fortificação de 500mL de água desmineralizada. Os padrões preparados são processados por SPE e analisados por LC-MS/MS, de modo idêntico às amostras, com a resposta instrumental a cumprir os requisitos de identificação da entidade química e a exibir uma altura no mínimo três vezes superior à do branco. O coeficiente de variação obtido para o *Fr* deve cumprir com o limite percentual de 20% para o desvio a admitir, podendo futuramente ser aceite por carta de controlo de indivíduos a construir com um número representativo de resultados, obtidos no decurso da execução do método. A aplicabilidade do valor médio de *Fr* a cada sessão de trabalho para o cálculo da concentração dos padrões de controlo e amostras depende do cumprimento desta condição [55].

Pode ser referida a particularidade de que, na eventualidade de ser aplicado um modelo ponderado de calibração, a execução do método na rotina laboratorial para o cálculo da concentração com recurso a um fator de resposta considera a relação do fator de ponderação definido com a resposta instrumental.

10.2.2 Padrões de controlo e ensaio de recuperação

Os padrões de controlo constituem instrumento para a validação dos resultados experimentais, sendo estes preparados a partir de uma solução de trabalho independente da utilizada para a calibração. A validação dos resultados compreende a aceitação dos padrões de verificação do limite de quantificação (PvLQ), padrão de controlo (PC) e percentagem de recuperação obtida para uma amostra de matriz fortificada, avaliados em termos de veracidade e precisão [55].

As concentrações dos padrões de controlo são calculadas através da multiplicação de $Fr_{médio}$ pela resposta instrumental, devendo ser aceites por concordância dentro dos limites definidos em carta de controlo de indivíduos, onde são registados os valores de concentração dos padrões analisados. Os resultados dos padrões de controlo devem cumprir com o critério estabelecido de 20% para o desvio aceite relativamente ao valor teórico de concentração [55].

A considerar que a recuperação média é avaliada para dada matriz no processo de validação do método e no decurso da sua execução em rotina. De acordo com o critério estabelecido, a percentagem de recuperação poderá variar dentro do intervalo 75% - 125% relativamente ao valor definido [55].

10.2.3 Expressões de cálculo da concentração

O recurso a um fator de resposta para cálculo da concentração do determinando pode ser traduzido por uma expressão que contabiliza o fator de concentração atingido para o extrato [55], respetivamente 1000x para o ometoato e 500x para a acrilamida:

$$Conc_{instrumental} (\mu g/L) = \frac{Fr \times A_{pico} \times V_{extrato}}{V_{amostra}}$$

Fr - Fator de Resposta determinado experimentalmente

A_{pico} - Altura de pico do padrão ou amostra

$V_{extrato}$ - Volume de extrato (mL)

$V_{amostra}$ - Volume de padrão ou amostra (500mL)

Na eventualidade de o volume de amostra disponível ser inferior aos 500mL utilizados na calibração com os padrões preparados e extraídos, o fator de concentração será menor, mas não inviabiliza a aplicação da expressão apresentada para o cálculo da concentração do determinando [55].

A concentração do analito na amostra vai ser afetado de correção pela recuperação média, determinada em condições de precisão intermédia, uma vez constituída a expressão [55]:

$$Conc (\mu g/L) = Conc_{instrumental} (\mu g/L) \times \frac{100}{\bar{R}_m}$$

$Conc_{instrumental} (\mu g/L)$ – Concentração da amostra calculada pelo *software*, entrando em consideração com o fator de concentração do extrato.

\bar{R}_m - Percentagem de recuperação média

Um aspeto importante a observar no decurso da rotina laboratorial é que os resultados de amostras que apresentem valores de concentração superiores ao limite de quantificação têm a sua validação dependentes da aceitação do resultado de ensaio de um padrão de controlo com concentração a um nível superior dentro da gama de trabalho [55]. A quantificação de analito pode ainda ser realizada por recurso a curva de calibração, a qual deve ser construída para níveis ajustados à concentração prevista com base no cálculo efetuado por fator de resposta [55].

10.2.4 Cartas de Controlo de Indivíduos

A construção de cartas de controlo compreende o registo e acumulação dos resultados experimentais ou valores processados em gráficos de dispersão, de modo a constituir uma ferramenta de controlo de qualidade interno que permite monitorizar o comportamento do método no decurso de sessões de trabalho diferentes [116]. Os dados são inicialmente compilados em cartas de aceitação, com o estabelecimento dos limites a ser definido por critérios percentuais de variação aceite, relativamente a um valor teórico esperado, assumido como verdadeiro. O desempenho do método na rotina laboratorial permite que seja atingido um número representativo de resultados e a elaboração de cartas de indivíduos, em que o valor de referência e os limites de aviso e

controle podem ser ajustados, a partir do cálculo da média e do desvio padrão dos resultados experimentais [98,116].

Pesticida ometoato

As cartas de aceitação/controle apresentadas nas Figuras 36 a 39 permitem avaliar os parâmetros de validação descritos para o método em rotina, especificamente determinar a aceitação da calibração e dos controles estipulados para o método, cumprida a condição de estes se encontrarem dentro dos limites percentuais estabelecidos. A notar que a obtenção de valores em dias diferentes possibilita que estes sejam contabilizados para a avaliação da precisão intermédia, coerentemente com a definição do termo [106,112].

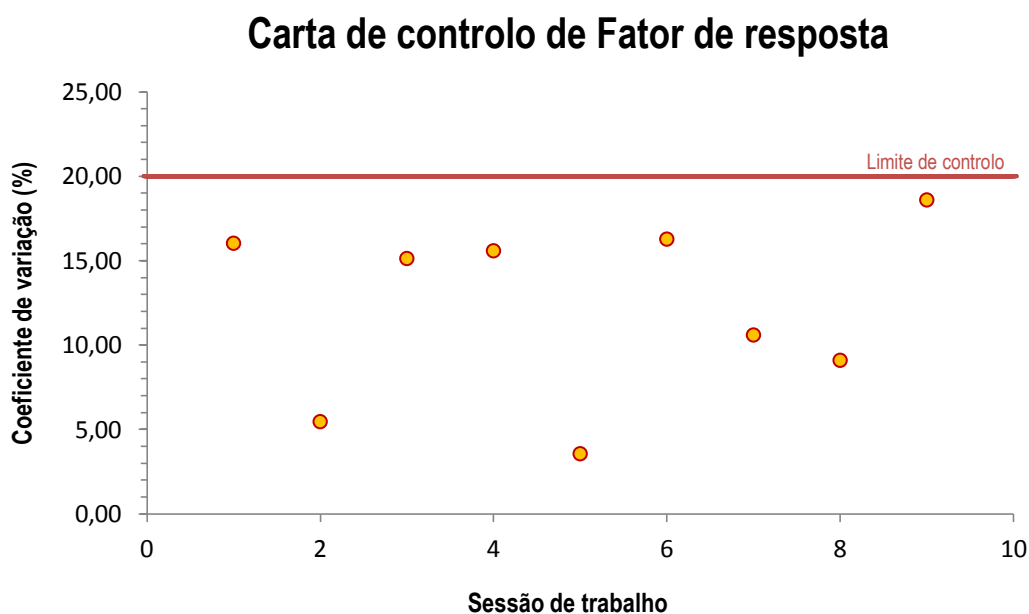


Figura 36 – Carta de aceitação do coeficiente de variação admitido para o fator de resposta, considerado um número mínimo de três replicados em cada sessão de trabalho.

Carta de controlo do PvLQ

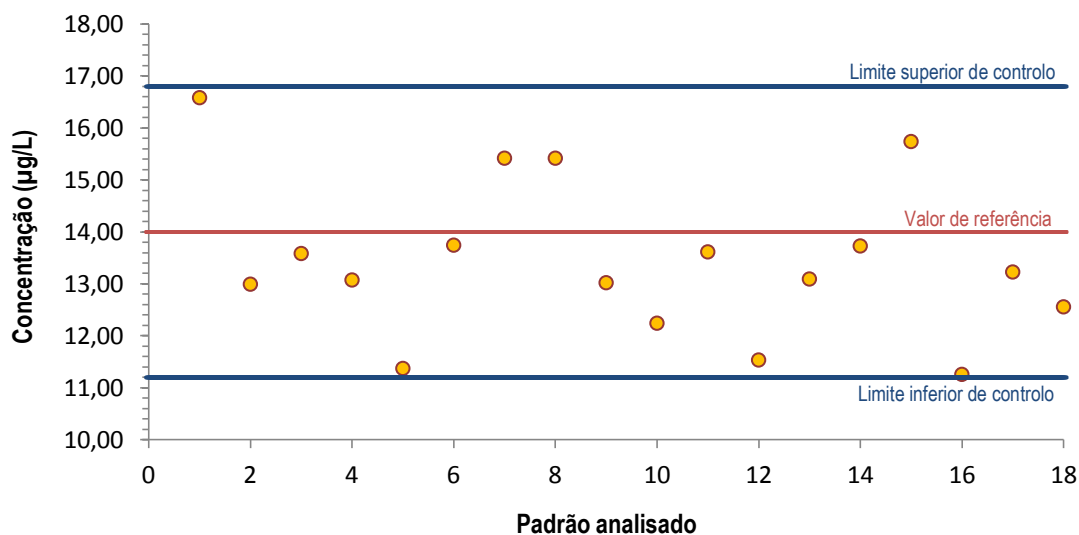


Figura 37 – Carta de aceitação do PvLQ, sendo admitido um desvio de 20% relativamente ao valor teórico de concentração do controlo.

Carta de controlo do PC

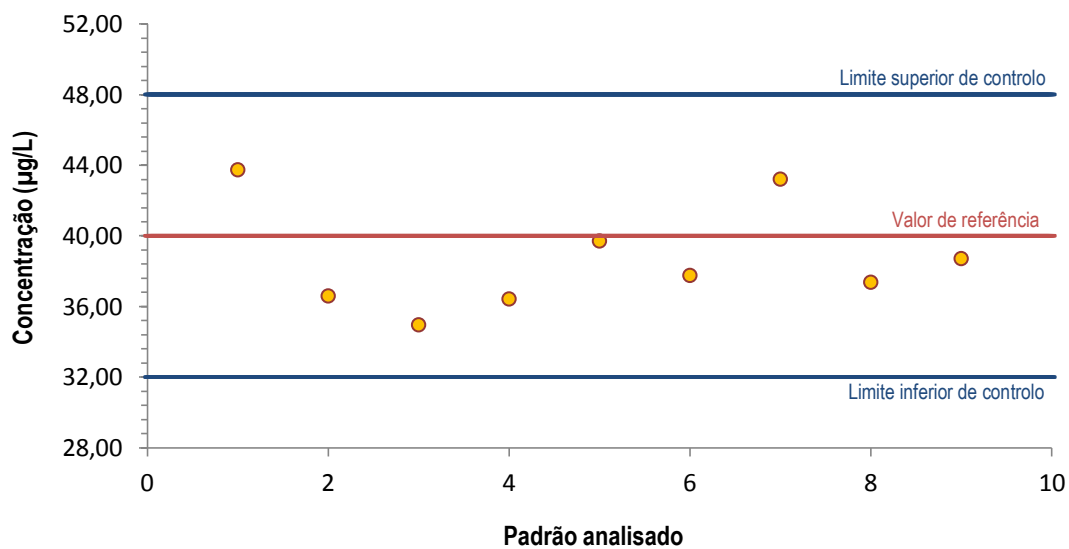


Figura 38 – Carta de aceitação do Padrão de Controlo (0,040µg/L), sendo admitido um desvio de 20% relativamente ao valor teórico de concentração do controlo.

Carta de controlo da recuperação

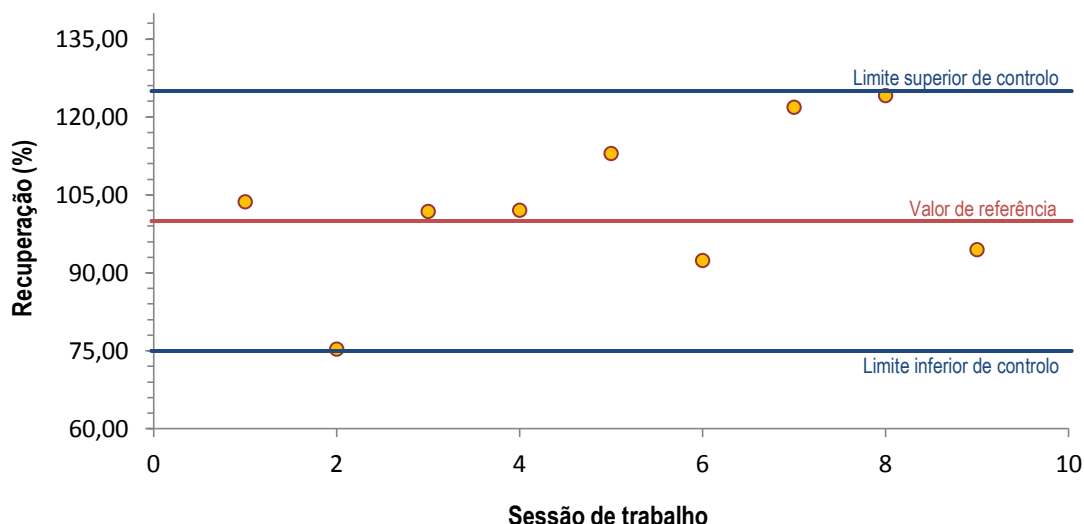


Figura 39 – Carta de aceitação da percentagem de recuperação em amostras de água de consumo fortificadas ao nível do limite de quantificação, estando o intervalo de aceitação definido entre 75% e 125%.

Em termos práticos, o cumprimento dos critérios de identificação da entidade química conjuntamente com a aceitação da calibração e controlos especificados para o método são utilizados para validar os resultados experimentais das amostras analisadas em dada sessão de trabalho.

Como nota adicional, o ensaio de recuperação do ometoato na matriz de água natural fica referenciado para inclusão na rotina laboratorial e aquisição de resultados em condições de precisão intermédia, com a construção da respetiva carta de controlo.

Acrilamida

A implementação do método na rotina laboratorial possibilita a aquisição de resultados em condições de precisão intermédia e a construção de cartas de controlo, as quais permitem a monitorização do desempenho das análises. O cumprimento dos limites definidos em carta pelos controlos do método determina a aceitação dos resultados experimentais [55,104,116], estando apresentados nas Figuras 40 a 42 os dados compilados para a acrilamida. Uma nota particular é de que o método praticado em rotina para a determinação de acrilamida não contempla a preparação e análise do padrão de controlo, motivada por um critério de racionalidade de a totalidade das amostras até ao momento analisadas apresentarem valores nulos de determinando.

Carta de controlo de Fr

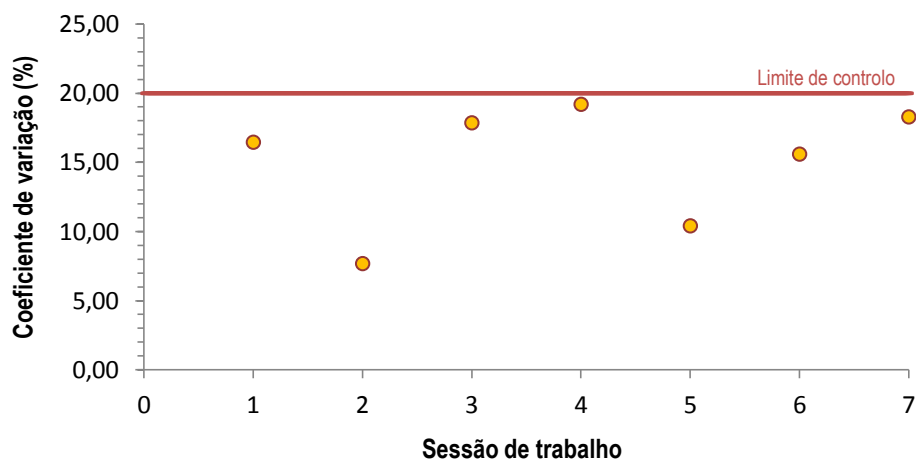


Figura 40 – Carta de aceitação do coeficiente de variação admitido para o fator de resposta, considerado um número mínimo de três replicados em cada sessão de trabalho.

Carta de controlo do PvLQ

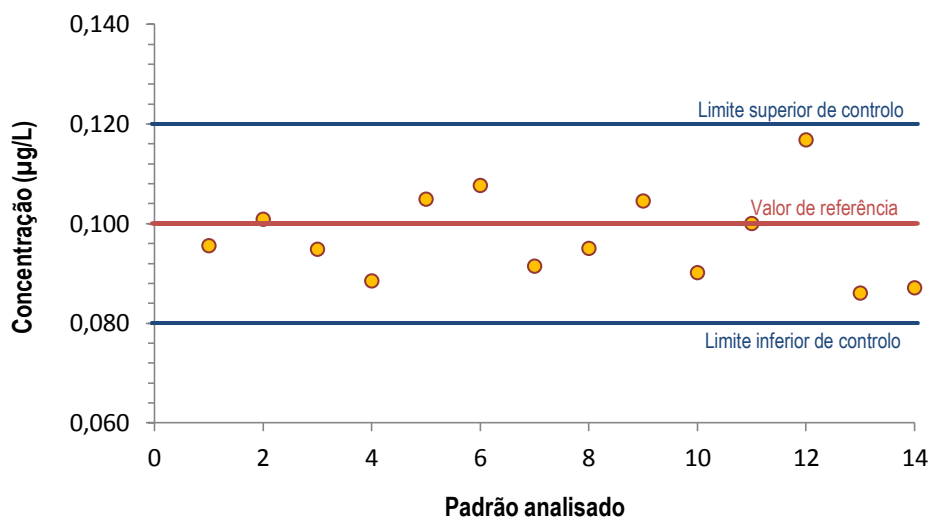


Figura 41 – Carta de aceitação do PvLQ, sendo admitido um desvio de 20% relativamente ao valor teórico de concentração do controlo.

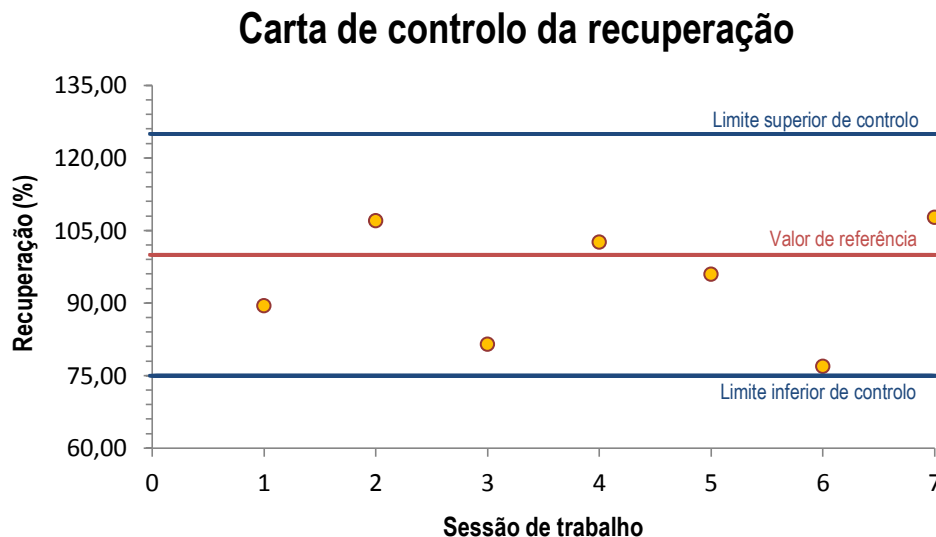


Figura 42 – Carta de aceitação da percentagem de recuperação em amostras de água de consumo fortificadas ao nível do limite de quantificação, estando o intervalo de aceitação definido entre 75% e 125%.

10.3 Exatidão

10.3.1 Precisão do método analítico

A exatidão dos resultados aborda como primeira componente a avaliação da precisão de medida, a qual deve ser realizada em condições de precisão intermédia e calculada com base nos dados compilados referentes aos padrões de controlo analisados em rotina, uma vez construídas as respetivas cartas de aceitação e definidos os critérios de validação para os controlos do método, de acordo com a expressão [55,106,119]:

$$SI = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^n (y_k - \bar{y})^2}$$

n – número de padrões/amostras, devendo atender a $n \geq 15$;

y_k – resultado de concentração do padrão/amostra;

\bar{y} – representa a média aritmética dos resultados ou o valor teórico de concentração.

Pesticida ometoato

Os resultados de precisão intermédia dos padrões de controlo estão apresentados na Tabela 31, expressos como o desvio padrão para os dois níveis de concentração estudados e que constituem o controlo de qualidade do método.

Tabela 31 – Precisão intermédia calculada para os padrões de controlo PvLQ e PC analisados em rotina.

	Nível PvLQ (0,014 µg/L)	Nível PC (0,040 µg/L)
Precisão intermédia (SI)	1,51E-03	3,02E-03

A precisão intermédia foi calculada com recurso aos resultados experimentais de $n=9$ sessões de trabalho.

A estimativa da precisão intermédia considerada para a quantificação da exatidão e incerteza do método corresponde ao valor absoluto mais elevado, de entre aqueles calculados para os padrões considerados [55][112].

A nível complementar as orientações do guia RELACRE 13 sugerem a realização da análise de variâncias (*ANOVA*) de fator único considerando os resultados de n ensaios independentes realizados no período de t dias, ou seja, em diferentes sessões de trabalho, para avaliar a precisão do método ao nível do limite de quantificação. A análise de variâncias compreende o tratamento dos resultados de um planeamento experimental com dois fatores, totalmente preenchido. Para este efeito, foram definidos os grupos como os padrões de verificação do limite de quantificação (PvLQ) analisados em cada sessão de trabalho, admitindo um total de t grupos constituídos por n elementos, com o objetivo de atingir um número de resultados $t(n-1) \geq 15$ que constitui o requisito mínimo recomendado para a aplicação da *ANOVA* [106]. No entanto, por inexistência de um número suficiente de sessões de trabalho para que seja cumprida esta condição, a análise de variâncias contemplou as duas réplicas do padrão de controlo ao longo de $t = 9$ dias de análise.

A análise de variâncias executada no *Microsoft Excel*® produz as somas dos quadrados, a partir das quais a divisão pelo número de graus de liberdade $t(n-1)$ resulta nos respetivos quadrados médios (MS). O desvio padrão residual ou repetibilidade corresponde à raíz quadrada de MS dentro dos grupos, traduzindo a variabilidade aleatória referente à preparação e processamento dos padrões, e subsequente análise [120]. As expressões algébricas apresentadas na Tabela 32 permitem calcular o desvio padrão entre grupos (precisão entre análises realizadas em dias diferentes) e estimar a precisão intermédia, por tratamento matemático dos MS intra e inter grupos [120]:

Tabela 32 – Estimativa da precisão dos resultados através da análise de variâncias.

Repetibilidade	$S_r = \sqrt{MS_r}$
Precisão entre grupos	$S_{inter} = \sqrt{\frac{MS_{inter} - MS_r}{n}}$
Precisão intermédia	$S_I = \sqrt{S_r^2 + S_{inter}^2}$

Um aspeto a observar é de que a realização de ensaios em dias diferentes possibilita a estimativa da precisão intermédia.

A repetibilidade (S_r) vai ser utilizada para o cálculo do limite de repetibilidade (r), o qual pode constituir o critério de aceitação para a diferença máxima observada entre os resultados de ensaios independentes, realizados sobre amostras/padrões idênticos na mesma sessão de trabalho. A delimitação da variação aceite vai determinar a conformidade dos valores produzidos na calibração e análise dos padrões de controlo da resposta instrumental [106,120].

Limite de repetibilidade: $r = S_r \times f(n)$

O respetivo limite é calculado através da multiplicação da repetibilidade (S_r) por um fator de gama crítico [$f(n)$] dependente do número de réplicas, em que o valor atribuído pode ser encontrado na norma ISO 5725, correspondente a [$f(n)$] = 2,8 para $n=2$ [106,119].

Os parâmetros de precisão calculados ao nível do LQ encontram-se apresentados na Tabela 33:

Tabela 33 – Estudo da precisão dos resultados com dois padrões de controlo ao LQ (0,014µg/L).

Parâmetros de precisão	S_r (µg/L)	S_{inter} (µg/L)	SI (µg/L)	r (%)
Ometoato	1,57E-03	4,60E-04	1,64E-03	31,50

A análise de variâncias foi realizada considerando $n=2$ réplicas do padrão de controlo em $t=9$ sessões de trabalho.

Em termos práticos, os resultados de duas determinações realizadas em condições de repetibilidade são aceites quando a diferença entre eles for inferior ou igual ao limite de repetibilidade [106].

A precisão intermédia (expressa como desvio padrão) calculada a partir dos resultados em carta de controlo e da análise de variâncias apresenta valores praticamente idênticos,

representando cerca de 1,6% do valor paramétrico, e um coeficiente de variação de 11,2%. As percentagens calculadas satisfazem o requisito legal de desempenho de métodos analíticos para a análise de pesticidas, cumprindo o limite de 25% especificado em diploma legal quando se determinam estes compostos individualmente.

Acrilamida

Os dados compilados em carta foram utilizados para calcular a precisão intermédia dos padrões de controlo, preparados ao nível do limite de quantificação, com o resultado a ser apresentado na Tabela 34:

Tabela 34 – Precisão intermédia calculada para os padrões de controlo PvLQ analisados em rotina.

Nível PvLQ (0,10 µg/L)	
<i>Precisão intermédia (SI)</i>	8,88E-03

A precisão intermédia foi calculada com recurso aos resultados experimentais de $n=7$ sessões de trabalho.

A consideração do maior valor absoluto de desvio padrão para a precisão intermédia encontra oportunamente uso na estimativa da incerteza do método analítico.

Os parâmetros de precisão calculados através da ANOVA para duas réplicas do padrão de verificação do LQ, considerados $t = 7$ sessões de trabalho, estão apresentados na Tabela 35:

Tabela 35 – Estudo da precisão dos resultados com dois padrões de controlo ao LQ (0,10µg/L).

Parâmetros de precisão	S_r (µg/L)	S_{inter} (µg/L)	SI (µg/L)	r (%)
Acrilamida	6,73E-03	5,99E-03	9,01E-03	18,84

A análise de variâncias foi realizada considerando $n=2$ réplicas do padrão de controlo em $t=7$ sessões de trabalho.

10.3.2 Veracidade ou justeza de medida

A exatidão dos resultados produzidos por um método analítico depende da consistência das determinações e da condição de estas representarem o valor real ou verdadeiro de concentração do mensurando. A fortificação da matriz a um valor definido de concentração permite que a recuperação traduza uma estimativa do erro da veracidade,

com o cálculo da recuperação média a ter como base os resultados de ensaio adquiridos em condições de precisão intermédia [112].

O guia validação de métodos analíticos publicado pela *Agilent Technologies* e baseado em orientações da *United States Pharmacopoeia* sugere o estudo da recuperação a três níveis de concentração, correspondentes ao limite de quantificação, a um nível intermédio e ao nível superior da curva de calibração [121]. No entanto, outra abordagem consiste na escolha do valor crítico de concentração, estabelecendo este como o ponto para avaliação da veracidade de medida. Nesta condição, o estudo da recuperação em condições de precisão intermédia apenas ao nível do limite de quantificação é consequência da disponibilidade de um número mais representativo de resultados para amostras fortificadas a este nível, circunstância decorrente da execução do método na rotina laboratorial e de as amostras de água de consumo monitorizadas apresentarem invariavelmente valores nulos de concentração de pesticida ou acrilamida. A observação desta circunstância definiu a exclusividade do ensaio a este nível e a sua inclusão permanente no método analítico de rotina, em cumprimento com os requisitos mínimos exigidos em documento normativo do Instituto Português de Acreditação [1].

Nas condições de precisão intermédia, as recuperações de ometoato e acrilamida em águas de consumo humano foram consideradas para calcular a recuperação média dos dois compostos nesta matriz, estando os resultados apresentados na Tabela 36:

Tabela 36 – Recuperação média do ometoato e acrilamida em água de consumo humano, calculada em condições de precisão intermédia.

	Recuperação média (%)	Número de Pontos
Ometoato	103,21	$n=9$
Acrilamida	94,49	$n=7$

O número de pontos considerado para o cálculo da $\% \bar{R}_m$ corresponde às sessões de trabalho compiladas em carta de controlo de indivíduos para o ometoato e acrilamida.

Encontra-se definido que os resultados das amostras analisadas são afetados de correção pela percentagem de \bar{R}_m calculada para dada matriz [55].

10.3.3 Estimativa da incerteza da determinação

A incerteza associada ao resultado pode ser estimada a partir da combinação das incertezas associadas à precisão e veracidade do método, assumido constante o

contributo das fontes de incerteza relevantes na realização dos ensaios necessários à determinação das respetivas componentes [112]. A estimativa da incerteza de medição foi determinada com base em dados produzidos em ambiente intralaboratorial, com o tratamento dos valores experimentais a permitir quantificar uma medida da precisão do método e da veracidade do resultado.

A determinação da incerteza associada à precisão é normalmente realizada em condições de precisão intermédia, de modo a refletir as flutuações de desempenho da técnica quando variam parâmetros experimentais usualmente mantidos constantes durante a sessão de trabalho. O contributo das incertezas de medição referentes a pesagens e utilização de material volumétrico está de modo simplista contido na **incerteza padrão associada à precisão**, por se considerar a sua influência na dispersão encontrada para os valores experimentais [98,112]:

$$\mu_{\text{precisão}} = S_{\text{precisão}}$$

A igualdade estabelece que a **incerteza padrão associada à precisão** ($\mu_{\text{precisão}}$) corresponde ao desvio padrão calculado para as réplicas de um padrão de controlo. Foram deste modo considerados para a determinação do desvio padrão os resultados de ensaio dos padrões de controlo independentes, analisados ao longo das sessões de trabalho e compilados em carta de controlo [98,112].

O estudo da dispersão dos valores experimentais foi realizado a dois níveis de concentração, correspondentes ao limite de quantificação e a um nível intermédio de concentração, estando deste modo a **incerteza padrão relativa associada à precisão** definida pela relação [112]:

$$\mu'_{\text{precisão}} = S_{\text{precisão}}/y$$

Na Tabela 37 são apresentados os valores da **incerteza padrão relativa associada à precisão** para os compostos ometoato e acrilamida, calculados para os dois níveis de concentração estudados:

Tabela 37 - Incerteza padrão relativa associada à precisão dos resultados.

Determinando	$\mu'_{precisão} (\%)$	
	Limite de quantificação	Nível de controlo
<i>Ometoato</i>	10,79	7,55
<i>Acrilamida</i>	8,85	- ^a

a) - O método de rotina para a análise de acrilamida apenas compreende o padrão de controlo ao nível do limite de quantificação.

A incerteza padrão relativa foi calculada com recurso aos resultados experimentais de $n=9$ sessões de trabalho para o ometoato e $n=7$ sessões de trabalho para a acrilamida.

A componente de precisão ou variabilidade de medida vai ser definida por majoração ou escolha do valor mais elevado para a **incerteza padrão relativa associada à precisão**.

No que respeita a veracidade do resultado produzido por um método analítico, esta pode ser averiguada por comparação do valor obtido na análise de materiais de referência certificados (MRC), ensaios de recuperação, análise da amostra através de um método de referência ou pelos resultados de ensaios interlaboratoriais (EIL). No âmbito deste trabalho experimental, a estimativa da incerteza associada à veracidade foi calculada com base na recuperação média, investigada por realização de ensaios independentes de amostras reais fortificadas [98,112].

A quantificação da **incerteza padrão associada à recuperação média** $\mu(\bar{R}_m)$ considera a incerteza constituída pela fortificação da amostra, estando expressa na equação [112]:

$$\mu(\bar{R}_m) = \bar{R}_m \times \sqrt{\left(\frac{S_{obs}^2}{n \times \bar{C}_{obs}^2}\right) + \left(\frac{\mu(C_{fortificação})}{C_{fortificação}}\right)^2}$$

O termo S_{obs}^2 representa a variância observada no ensaio de um número n de amostras fortificadas, e \bar{C}_{obs}^2 expressa a média aritmética da diferença de concentração entre amostra fortificada e não fortificada, correspondente ao numerador na expressão da recuperação média.

A execução rigorosa e cuidada das operações gravimétricas e volumétricas envolvidas na preparação dos padrões e amostras fortificadas, aliada ao fato de assumir-se contida no resultado experimental a incerteza introduzida por estes processos, determina que o último termo da raiz possa ser desprezado, conduzindo à simplificação da expressão para a **incerteza padrão associada à veracidade** [112]:

$$\mu(\bar{R}_m) = \bar{R}_m \times \sqrt{\left(\frac{S_{obs}^2}{n \times \bar{C}_{obs}^2}\right)} \quad e \quad \mu(\bar{R}_m) = \bar{R}_m \times \frac{CV}{\sqrt{n}}$$

A aplicação das equações aos valores experimentais permitiu calcular a **incerteza padrão associada à recuperação média** para o ometoato e acrilamida, com o resultado percentual obtido para as respectivas matrizes a ser apresentado na Tabela 38:

Tabela 38 - incerteza padrão associada à recuperação média.

	$\mu(\bar{R}_m) \%$	Número de Pontos
<i>Ometoato</i>	5,08	$n=9$
<i>Acrilamida</i>	4,64	$n=7$

O número de pontos considerado para o cálculo da $\mu(\bar{R}_m)$ corresponde às sessões de trabalho compiladas em carta de controle de indivíduos para o ometoato e acrilamida.

A estimativa da incerteza padrão da veracidade avalia a existência de erros sistemáticos que causam o desvio dos valores experimentais, determinando a necessidade de correção matemática do enviesamento dos resultados [112]. A consideração da significância do desvio causado pode ser avaliada através da aplicação do teste estatístico de *t-student*, em que se averigua se a recuperação média obtida para o método é significativamente diferente da unidade [112]:

$$t_{obs} = \frac{|100 - \bar{R}_m|}{\mu(\bar{R}_m)}$$

A decisão acerca da necessidade de aplicar um fator de correção ao resultado tem por base a comparação entre o valor (t_{obs}) e o valor crítico (t_{crit}) da tabela de distribuição de *student* bilateral, para $(n - 1)$ graus de liberdade e um nível de confiança de 95% (Tabela 39), em que n representa o número de ensaios considerados para o cálculo da recuperação média.

A ocorrência de um valor (t_{obs}) inferior ao valor crítico tabelado permite afirmar que a recuperação obtida não é diferente de 100%, não existindo um desvio sistemático que afete significativamente o desempenho do método. Na ausência de diferença significativa da \bar{R}_m relativamente à unidade, a **incerteza padrão relativa associada à veracidade** $\mu'(\bar{R}_m)$ pode ser assumida como idêntica ao valor de $\mu(\bar{R}_m)$.

Tabela 39 – teste *t-student* para comparação da \bar{R}_m de ometoato e acrilamida em amostras fortificadas.

	(t_{obs})	(t_{crit})	Número de Pontos
<i>Ometoato</i>	0,632	2,306	$n=9$
<i>Acrilamida</i>	1,189	2,447	$n=7$

com (n-1) graus de liberdade

Para níveis vestigiais de concentração, essencialmente predispostos a maiores desvios, a recuperação do método pode ser diferente da unidade, procedendo-se ao cálculo da **incerteza padrão relativa associada à veracidade** $\mu'(\bar{R}_m)$ através da equação [112]:

$$\mu'(\bar{R}_m) = \mu(\bar{R}_m)/\bar{R}_m$$

Apesar de não existir uma diferença estatisticamente significativa, a correção da veracidade do resultado através do cálculo da $\mu'(\bar{R}_m)$ não deixa de constituir uma prática correta, pelo que os valores apresentados na Tabela 40 serão contabilizados para a quantificação da **incerteza padrão combinada** do método.

Tabela 40 - Incerteza-padrão relativas associada à veracidade dos resultados.

	$\mu'(\bar{R}_m)$ %	Número de Pontos
<i>Ometoato</i>	4,92	$n=9$
<i>Acrilamida</i>	4,91	$n=7$

O número de pontos considerado para o cálculo da $\mu'(\bar{R}_m)$ corresponde às sessões de trabalho compiladas em carta de controlo de indivíduos para o ometoato e acrilamida.

A **incerteza padrão combinada** $\mu(y)$ foi determinada com base no contributo da incerteza associada à precisão e da incerteza atribuída à veracidade do método, através da combinação de parâmetros discutidos anteriormente [112]:

$$\mu(y) = y \times \sqrt{(u'_{precisão})^2 + (\mu'(\bar{R}_m))^2}$$

A estimativa do contributo das diversas componentes da incerteza foi ponderada por recurso a um dado número de ensaios em replicado, estando assim consideradas na Tabela 41 a **incerteza padrão combinada** e a multiplicação de $\mu(y)$ por um fator de expansão k , comumente igual a 2, para o cálculo da **incerteza combinada expandida**, com um nível de confiança de 95% [112]:

$$U(y) = \mu(y) \times k$$

Tabela 41 - Incerteza-padrão combinadas e incerteza combinada expandida dos resultados.

	$\mu(y) \%$	$U(y) \%$	Número de Pontos
<i>Ometoato</i>	11,86	23,71	$n=9$
<i>Acrilamida</i>	10,12	20,25	$n=7$

O número de pontos considerado para o cálculo de $\mu(y)$ e $U(y)$ corresponde às sessões de trabalho compiladas em carta de controle de indivíduos para o ometoato e acrilamida.

A incerteza combinada expandida pode ser transposta a toda a gama de trabalho, expressando a validade do método analítico em termos de exatidão. As incertezas associadas à determinação de ometoato e acrilamida em água de consumo humano estão em valor percentual, devendo este ser transformado em unidade de concentração para a emissão em boletim de análise. Assume ainda importância assinalar que os valores percentuais calculados para a incerteza satisfazem o critério de desempenho estabelecido em 25% para a exatidão de métodos instrumentais de análise de pesticidas.

A título de discussão, na eventualidade de o estudo da recuperação ser realizado a dois níveis, a **incerteza combinada** e a **incerteza combinada expandida** devem ser majoradas por escolha do valor mais elevado para a incerteza. Este valor corresponde frequentemente ao nível de concentração mais baixo, por existir predisposição a uma maior amplitude de variação da incerteza associada ao resultado.

No âmbito de enquadramento do método para a determinação de ometoato, a emissão de resultados de pesticidas em águas de consumo pode ser expressa como concentração individual, ou calculado o parâmetro *Total de Pesticidas*, obtido pela soma das concentrações dos determinando que apresentem concentração superior ao limite de quantificação [1,55]. Complementarmente existe a considerar que a incerteza expandida associada ao *Total de Pesticidas* resulta da combinação da incerteza padrão associada a cada um dos compostos, podendo ser expressa como [55]:

$$U_{expandida} (Total\ de\ Pesticidas) = fator\ de\ expansão \times \sqrt{(\mu_{Pest\ 1})^2 + (\mu_{Pest\ 2})^2 + \dots + (\mu_{Pest\ n})^2}$$

11 Conclusões:

A otimização das condições de MS/MS, concretamente a voltagem do cone e a energia de colisão, define a instrução do sistema para a monitorização de fragmentos específicos, constituindo o tempo de retenção e a razão de intensidades dos iões fragmento os argumentos para a identificação inequívoca dos compostos, cumpridos os critérios de aceitação definidos para estes parâmetros na rotina laboratorial. O critério de confirmação da identidade do determinando caracterizado pela razão $[MRM_1/MRM_2]$ apresentou valores estáveis para os níveis definidos da gama linear, com o valor médio de 1,11 e coeficiente de variação 9,2% para o ometoato, e uma razão $[MRM_1/MRM_2]$ média de 20,91 e coeficiente de variação 10,7% para a acrilamida.

A regressão linear simples utilizada para calibração da resposta evidenciou a linearidade, avaliada através do coeficiente de determinação superior a 0,995 e do resultado dos testes estatísticos realizados. A repetibilidade aos dois níveis de concentração estudados para os analitos satisfaz o critério de aceitação estabelecido para o coeficiente de variação, quando avaliados padrões preparados de forma independente e amostras fortificadas de matrizes reais. Os coeficientes de variação calculados em condições de repetibilidade foram 16,7% para o ometoato e 9,4% para a acrilamida, em amostras de água de consumo humano fortificadas ao nível do limite de quantificação. O estudo da homocedasticidade entre os dois níveis de concentração verificou a aplicação do modelo de calibração a um intervalo em que a resposta apresenta variâncias comparáveis.

Os fatores de concentração atingidos na extração em fase sólida, e as elevadas recuperações para as matrizes fortificadas aos dois níveis de concentração constituem um fator preponderante para que sejam atingidos limites de quantificação ($LQ = 0,014\mu\text{g/L}$ para o ometoato e $LQ = 0,100\mu\text{g/L}$ para a acrilamida) que permitem a determinação dos compostos a níveis enquadrados com aqueles especificados na Diretiva Europeia de Qualidade da Água.

A aquisição de dados em condições de precisão intermédia e a construção de cartas de controlo de indivíduos permitem monitorizar o desempenho das análises, com o tratamento dos resultados a permitir a quantificação da precisão e da veracidade de medida, inferidas respetivamente a partir da dispersão dos pontos experimentais e da

recuperação média de cada composto para dada matriz. As componentes da exatidão, em termos de precisão intermédia e veracidade de medida são utilizadas para estimar a incerteza do resultado experimental.

O cumprimento dos objetivos de implementação e validação de métodos analíticos para o ometoato e acrilamida permite a contratação do Cesab para a realização das análises requisitadas.

Uma importante consideração a ter diz respeito à validação como um processo contínuo, em que o controlo de qualidade associado e uma filosofia de melhoria contínua podem oportunamente contribuir para o refinamento de parâmetros avaliados, assim como o ajuste dos valores de referência e limites definidos para os controlos previamente estabelecidos.

12 Referências

- [1] Instituto Português de Acreditação (IPAC), Guia para a Acreditação de Laboratórios Químicos - OGC002, (2011) 1–12.
- [2] ERSAR, ERSAR - Entidade Reguladora dos Serviços de Água e Resíduos, (n.d.); Disponível em: <http://www.ersar.pt/website/>, [consulta: 12-11-2013].
- [3] República Portuguesa, Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de Agosto em Diário da República, (2007); Disponível em: http://www.azores.gov.pt/NR/rdonlyres/98BE85B2-2E6E-4634-B5D3-6ED2ED120B09/431763/DL306_2007Aguadestinadaaconsumohumano.pdf, [consulta: 22-05-2014].
- [4] Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides - Article 1. Objectives of the Code, 2003; Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/005/y4544e/y4544e02.htm#bm2.2>, [consulta: 20-10-2013].
- [5] A. Vasilescu, M. Medvedovici, Pesticides: Encyclopedia of Analytical Science, Second Edition, volume 7, Elsevier Acad. Press. (2005) 55–72.
- [6] US Environmental Protection Agency: Office of Pesticide Program, Types of Pesticides, (2001); Disponível em: <http://www.epa.gov/pesticides/about/types.htm>, [consulta: 10-12-2013].
- [7] British Columbia Ministry of Agriculture, Agriculture: Pesticide Wise, (n.d.); Disponível em: http://www.agf.gov.bc.ca/pesticides/a_1.htm, [consulta: 10-12-2013].
- [8] F. Fishel, Pest Management and Pesticides: A Historical Perspective, Electron. Data Inf. Source. P1219 (2009) 1-5.
- [9] US Environmental Protection Agency: Office of Pesticide Programs, DDT - A Brief History and Status | Pesticides | US EPA, (2012); Disponível em: <http://www.epa.gov/pesticides/factsheets/chemicals/ddt-brief-history-status.htm>, [consulta: 11-12-2013].
- [10] Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), The State of Food and Agriculture: Lessons from the Past Fifty Years, FAO, 2000; Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/x4400e/x4400e08.htm>, [consulta: 11-12-2013].
- [11] A. Grube, D. Donaldson, T. Kiely, L. Wu, Pesticide Industry Sales and Usage | Pesticides | US EPA, Washington DC, 2011; Disponível em: <http://www.epa.gov/opp00001/pestsales/>, [consulta: 11-12-2013].

- [12] M.W. Aktar, D. Sengupta, A. Chowdhury, Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards., *Interdiscip. Toxicol.* 2 (2009) 1–12.
- [13] P. Sandra, A.M. Rodrigues, V. Ferreira, V.V. Cardoso, E. Ferreira, M.J. Benoliel, Determination of several pesticides in water by solid-phase extraction, liquid chromatography and electrospray tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1150 (2007) 267–278.
- [14] European Union (UE), Directive establishing a framework for Community action in the field of water policy, 2000/60/CE, Brussels, 2000; Disponível em: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2000L0060:20090625:EN:PDF>, [consulta: 12-12-2013].
- [15] Ministério do Ordenamento do Território Mar e Ambiente: Direção Geral de Alimentação e Veterinária, Guia dos produtos fitofarmacêuticos - Lista dos produtos com venda autorizada, Lisboa, 2013; Disponível em: http://geo.drapn.min-agricultura.pt/agri/archivos/publicaciones/1370342513_GUIA_PFVA_2013_FIN_AL%255B1%255D.pdf, [consulta: 10-11-2013].
- [16] Direção Geral de Alimentação e Veterinária, Projeto de Plano de Ação Nacional para o Uso Sustentável dos Produtos Fitofarmacêuticos, DGAV. (2013); Disponível em: http://www.dgav.pt/fitofarmaceuticos/lista/Introd_lista/insec_acar_lista.htm, [consulta: 10-11-2013].
- [17] Direção Geral de Alimentação e Veterinária, Lista de Pesticidas de pesquisa obrigatória para 2014 em águas destinadas ao consumo humano, Lisboa, 2013; Disponível em: <http://www.ersar.pt/website/ViewContent.aspx?FolderPath=&FinalPath=Not%C3%ADcias&Name=Listadepesticidasapesquisarem2014&Section=News&SubFolderPath>, [consulta: 21-11-2013].
- [18] E.Y. Spencer, R.D. O'Brien, Chemistry and Mode of Action of Organophosphorus Insecticides, *Annu. Rev. Entomol.* Vol. 2 (2003) 261–278.
- [19] W. Temple, N. Smith, International Programme on Chemical Safety - Poisons Information Monograph: Organophosphorus pesticides, IPCS - Inchem. (1989); Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/pims/chemical/pimg001.htm>, [consulta: 23-11-2013].
- [20] M. Kazemi, A. Tahmasbi, R. Valizadeh, A. Naserian, A. Soni, Organophosphate pesticides: A general review, *Agric. Sci. Res. J.* 2 (2012) 512–522.
- [21] Office of Chemical Safety and Health Protection, Draft review of the mammalian toxicology and metabolism/toxicokinetics of omethoate, Canberra (2007) 9-45.
- [22] T. Eleršek, M. Filipič, Pesticides - The Impacts of Pesticides Exposure: Organophosphorus Pesticides - Mechanisms Of Their Toxicity, 1st ed., InTech, National Institute of Biology - Slovenia (2011) 243-257.

- [23] P. Toft, J. Fawell, E. Ohanian, M. Giddings, Y. Magara, Dimethoate in Drinking-water Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality, Ottawa (2004) 1-5.
- [24] S. Guimarães, J. Gonçalves, W. Osswald, Terapêutica Medicamentosa e suas Bases Farmacológicas, 4th ed., Porto Editora, Porto (2006) 13-60.
- [25] D.M. Quinn, Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states, *Chem. Rev.* 87 (1987) 955–979.
- [26] Agriculture and Consumer Protection, Pesticide Residues in Food: Dimethoate/Omethoate/Formothion, Rome (1998) 391-403.
- [27] Guidechem - Chemical Trading Guide, Omethoate Properties, (n.d.); Disponível em: <http://www.guidechem.com/reference/dic-7886.html>, [consulta: 2-12-2013].
- [28] University of Hertfordshire, Pesticide Properties Database: Omethoate, IUPAC - Int. Union Pure Appl. Chem. (2011); Disponível em: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/492.htm>, [consulta: 3-12-2013].
- [29] J.T. Zacharia, Identity, Physical and Chemical Properties of Pesticides, in: M. Stoytcheva (Ed.), *Pestic. Mod. World - Trends Pestic. Anal.*, 1st ed., Intech, Tanzania (2011) 1-19.
- [30] World Health Organization, Specifications and Evaluations for Public Health Pesticides - Dimethoate, Rome (2011) 6-33; Disponível em: http://www.who.int/whopes/quality/en/Dimethoate_eval_specs_WHO_June_2012.pdf, [consulta: 3-12-2013].
- [31] C. Klassen, L. McKeeman, Casarett and Doull's Toxicology - The basic science of poisons, 7th ed., McGraw-Hill, Kansas City (2008) 11-34.
- [32] L. Chen, T. Zhao, C. Pan, J.H. Ross, R.I. Krieger, Preformed biomarkers including dialkylphosphates (DAPs) in produce may confound biomonitoring in pesticide exposure and risk assessment., *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 9342–51.
- [33] M.P. Kavvalakis, A.M. Tsatsakis, The atlas of dialkylphosphates; assessment of cumulative human organophosphorus pesticides' exposure., *Forensic Sci. Int.* 218 (2012) 111–22.
- [34] T. Roberts, D. Hutson, *Metabolic Pathways of Agrochemicals: Insecticides and fungicides*, 1st ed., Royal Society of Chemistry, Bodmin (1999) 397.
- [35] K. V. Ragnarsdottir, Environmental fate and toxicology of organophosphate pesticides, *J. Geol. Soc. London.* 157 (2000) 859–876.
- [36] R.D. Wauchope, The Pesticide Content of Surface Water Draining from Agricultural Fields—A Review¹, *J. Environ. Qual.* 7 (1978) 459.

- [37] World Health Organization: Joint Committee on Pesticide Residues, Omethoate - Pesticide Residues, Rome, 1975; Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v075pr31.htm>, [consulta: 22-11-2013].
- [38] C. Tomizawa, Degradation of organophosphorus pesticides in soils with special reference to anaerobic soil conditions., *Environ. Qual. Saf.* 4 (1975) 117–27.
- [39] European Union (UE), Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption, *Off. J. Eur. Communities*. L330 (1998) 32-53
- [40] World Health Organization: Joint Committee on Pesticide Residues, Omethoate Pesticide Residues: 1984 evaluations, Rome, 1984; Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v84pr32.htm>, [consulta: 22-11-2013].
- [41] World Health Organization, International Programme on Chemical Safety Environmental Health Criteria, Geneva, 1985; Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc49.htm>, [consulta: 12-12-2013].
- [42] T. Nishimura, J. Cotruvo, M. Giddings, J. Fawell, Acrylamide in Drinking-water: Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality, Geneva (2011) 1-10
- [43] US Environmental Protection Agency, Consumer factsheet on: acrylamide, *Natl. Prim. Drink. Water Regul.* (2013); Disponível em: <http://www.epa.gov/ogwdw/pdfs/factsheets/soc/acrylamide.pdf>, [consulta: 12-12-2013].
- [44] International Agency for Research of Cancer (IRAC), Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Geneva (1994) 389-433.
- [45] S. Cavalli, S. Polesello, G. Sacconi, Determination of acrylamide in drinking water by large-volume direct injection and ion-exclusion chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*. 1039 (2004) 155–159.
- [46] I. Cote, B. Fubini, P. Gupta, R. Newton, J. Rice, C. Portier, Report of the advisory group to recommend priorities for the International Agency for Research of Cancer (IRAC), Lyon (2008) 18
- [47] E. Tareke, P. Rydberg, P. Karlsson, S. Eriksson, M. Törnqvist, Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs., *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 4998–5006.
- [48] R.E. Lofstedt, Science communication and the Swedish acrylamide “alarm,” *J. Health Commun.* 8 (2003) 407–32.

- [49] US Environmental Protection Agency, Toxics Release Inventory Program (TRI), (n.d.); Disponível em: <http://www2.epa.gov/toxics-release-inventory-tri-program>, [consulta: 9-12-2013].
- [50] Institute for Health and Consumer Protection, European Union Risk Assessment Report on acrylamide, 1st ed., European Chemicals Bureau, Luxembourg (2002) 7-28.
- [51] P.D. DeArmond, A.L. DiGoregorio, Characterization of liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of acrylamide in complex environmental samples., *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 4159–66.
- [52] D. Taeymans, J. Wood, P. Ashby, I. Blank, A. Studer, R.H. Stadler, et al., A review of acrylamide: an industry perspective on research, analysis, formation, and control., *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44 (2004) 323–47.
- [53] Office of Pollution Prevention and Toxics, Chemical Summary for Acrylamide, (1994); Disponível em: http://www.epa.gov/chemfact/s_acryla.txt, [consulta: 14-12-2013].
- [54] E.W. Rice, R. Baird, A. Eaton, L. Clesceri, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd ed., American Water Works Association (AWWA), Baltimore (2012) 1060-1079;
- [55] J. Pereira, S. Pinheiro, Determinação de Pesticidas: Método de extração em fase sólida e cromatografia líquida de ultra eficiência associada a espectrometria de massa (SPE-UPLC-MS/MS), CESAB (2013) 1-29.
- [56] E.T. Furlong, B. Anderson, S. Werner, P. Soliven, L. Coffey, M. Burkhardt, Methods of Analysis by the U.S. Geological Survey National Water Quality Laboratory - Determination of pesticides in water by graphitized carbon - based solid-phase extraction and high performance liquid chromatography/mass spectrometry, Denver, 2001; Disponível em: <http://nwql.usgs.gov/Public/pubs/WRIR01-4134.pdf>, [consulta: 26-10-2013].
- [57] S. Duirk, L. Desetto, G. Davis, Fate of High Priority Pesticides During Drinking Water Treatment, US Environmental Protection Agency: Office of Research and Development, Washington DC, 2008; Disponível em: http://www.epa.gov/athens/publications/reports/Duirk_600R08089_Fate_High_Priority_Pesticides.pdf, [consulta: 29-10-2013].
- [58] C. MacQuarrie, S. Wilton, The ins and outs of dechlorination, *Hatch. Int.* Vol 6 (2002) 26-28.
- [59] US Environmental Protection Agency, US EPA Method 8316: Acrylamide, acrylonitrile and acrolein by high performance liquid chromatography (HPLC), (1994), Disponível em: <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/8316.pdf>, [consulta: 14-12-2013].

- [60] T. Wenzl, M.B. de la Calle, E. Anklaam, Acrylamide Analytical Methods Working Group Backgrounder - Overview of Analytical Methods, (2003) 1-9.
- [61] T. Samuels, S. Obare, Advances in Analytical Methods for Organophosphorus Pesticide Detection, 1st ed., Intech, Kalamazoo, Chapter 6 (2011) 95-113.
- [62] H.Y. Xiaojing, L., Pingsheng G., Rongfei P., Cong H., Determination of 23 Organophosphorous Pesticides in Surface Water Using SPME Followed by GC-MS, J. Chromatogr. Sci. 48 (2010).
- [63] J. Shi, S. Chen, Y. Hu, L. Wan, J. Zhang, F. Yang, et al., Rapid determination of pesticide residues in Chinese materia medica using QuEChERS sample preparation followed by gas chromatography-mass spectrometry, Acta Pharm. Sin. B. 2 (2012) 286-293.
- [64] A. Sadowska-Rociek, M. Surma, E. Cieřlik, Application of QuEChERS method for simultaneous determination of pesticide residues and PAHs in fresh herbs., Bull. Environ. Contam. Toxicol. 90 (2013) 508-13.
- [65] S. Dulaurent, F. Saint-Marcoux, P. Marquet, G. Lachâtre, Simultaneous determination of six dialkylphosphates in urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. B. 831 (2006) 223-229.
- [66] Sigma Aldrich, Guide to Solid Phase Extraction, (1998); Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>, [consulta: 18-12-2013].
- [67] S. Lacorte, D. Barceló, Determination of organophosphorus pesticides and their transformation products in river waters by automated on-line solid-phase extraction followed by thermospray liquid chromatography-mass spectrometry., J. Chromatogr. A. 712 (1995) 103-12.
- [68] T.B. Jordan, D.S. Nichols, N.I. Kerr, Selection of SPE cartridge for automated solid-phase extraction of pesticides from water followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry., Anal. Bioanal. Chem. 394 (2009) 2257-66.
- [69] A. Townshend, C.F. Poole, P.J. Worsfold, Encyclopedia of Analytical Science, Ten-Volume Set, 2nd ed., Elsevier Academic Press, Volume 7 (2004) 6109-6113.
- [70] T. Hankemeier, A.J.H. Louter, F.D. Rinkema, U.A.T. Brinkman, On-line coupling of solid-phase extraction and gas chromatography with atomic emission detection for analysis of trace pollutants in aqueous samples, Chromatographia. 40 (1995) 119-124.
- [71] M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, F.J. Schenck, Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce, J. AOAC Int. 86 (2003) 412-31.

- [72] M. Ye, Y. Yang, A. Trinh, Analysis of Multi-Pesticide Residues in Vegetables, Food, and Fruits by SPE/GC-MS, Sigma Aldrich. (n.d.); Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/Posters/t405020h.pdf>, [consulta: 15-12-2013].
- [73] S.J. Lehotay, A. de Kok, M. Hiemstra, P. Van Bodegraven, Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection., J. AOAC Int. 88 (2005) 595–614.
- [74] M. Castillo, C. González, A. Miralles, An evaluation method for determination of non-polar pesticide residues in animal fat samples by using dispersive solid-phase extraction clean-up and GC-MS., Anal. Bioanal. Chem. 400 (2011) 1315–28.
- [75] M. et al Grimalt, J.O.; Pico, Y.; Blasco, Cristina; Vazquez-Roig, Pablo; Onghena, Analysis of insecticides in honey by liquid chromatography–ion trap-mass spectrometry: Comparison of different extraction procedures, J. Chromatogr. A. 1218 (2011) 4892–4901.
- [76] S. Dutta, A. Das, Handbook of Green Analytical Chemistry, 1st ed., Wiley, Chichester, (2012), 105-106.
- [77] Sigma Aldrich Company, SPME/HPLC Interface - Product Specification, (1997); Disponível em: http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/Product_Information_Sheet/4760.pdf, [consulta: 14-03-2014].
- [78] J. Rosén, A. Nyman, K.-E. Hellenäs, Retention studies of acrylamide for the design of a robust liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for food analysis, J. Chromatogr. A. 1172 (2007) 19–24.
- [79] E. Bermudo, E. Moyano, L. Puignou, M.T. Galceran, Determination of acrylamide in foodstuffs by liquid chromatography ion-trap tandem mass-spectrometry using an improved clean-up procedure, Anal. Chim. Acta. 559 (2006) 207–214.
- [80] L. Lucentini, E. Ferretti, E. Veschetti, L. Achene, L. Turrio-Baldassarri, M. Ottaviani, et al., Determination of Low-Level Acrylamide in Drinking Water by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry, J. AOAC Int. 92 (2008) 263–70.
- [81] K. Kawata, T. Ibaraki, A. Tanabe, H. Yagoh, A. Shinoda, H. Suzuki, et al., Gas chromatographic – mass spectrometric determination of hydrophilic compounds in environmental water by solid-phase extraction with activated carbon fiber felt, J. Chromatogr. A. 911 (2001) 75–83.
- [82] S. Chu, C.D. Metcalfe, Analysis of acrylamide in water using a coevaporation preparative step and isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry., Anal. Chem. 79 (2007) 5093–6.

- [83] D.J. Smith, G.A., Pepich, B.V., Munch, EPA Method 536 Determination of Triazine Pesticides and their Degradates in Drinking Water by Liquid Chromatography Electrospray Ionization - Tandem Mass Spectrometry (LC/ESI-MS/MS), (2007); Disponível em: <http://www.epa.gov/ogwdw/methods/pdfs/methods/met536.pdf>, [consulta: 12-11-2013].
- [84] M. Contreras, F. Mocholí, Analysis of Non-Volatile Pesticide Residue in Vegetables by Positive/Negative ESI LC/MS/MS, (2003); Disponível em: <http://www.chem.agilent.com/Library/applications/lcms11.pdf>, [consulta: 19-11-2013].
- [85] US Environmental Protection Agency, EPA Method 8141B: Organophosphorus compounds by gas chromatography, (2007); Disponível em: <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/8141b.pdf>, [consulta: 23-11-2013].
- [86] G. Gervais, S. Brosillon, A. Laplanche, C. Helen, Ultra-pressure liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry for multiresidue determination of pesticides in water, *J. Chromatogr. A.* 1202 (2008) 163–172.
- [87] P.C. Aguas, M.J. Fitzhenry, G. Giannikopoulos, P. Varelis, Analysis of acrylamide in coffee and cocoa by isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry., *Anal. Bioanal. Chem.* 385 (2006) 1526–31.
- [88] P. Schoenmakers, R. Smits, A. Townshend, N.J. Nielsen, K. Granby, R. V. Hedegaard, et al., A liquid chromatography – tandem mass spectrometry method for simultaneous analysis of acrylamide and the precursors, asparagine and reducing sugars in bread, *Anal. Chim. Acta.* 557 (2006) 211–220.
- [89] US Environmental Protection Agency, EPA Method 8032A - Acrylamide by gas chromatography, (1996); Disponível em: <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/8032a.pdf>, [consulta: 13-12-2013].
- [90] A. Hashimoto, Improved method for the determination of acrylamide monomer in water by means of gas-liquid chromatography with an electron-capture detector, *Analyst.* 101 (1976) 932.
- [91] UK Environment Agency, The determination of acrylamide in waters using chromatography with mass spectrometric detection, (2009); Disponível em: https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/316781/Acrylamide-227b.pdf, [consulta: 16-12-2013].
- [92] M. Weideborg, T. Källqvist, K.E. Ødegård, L.E. Sverdrup, E.A. Vik, Environmental risk assessment of acrylamide and methylolacrylamide from a grouting agent used in the tunnel construction of romeriksporten, norway, *Water Res.* 35 (2001) 2645–2652.

- [93] S. Cavalli, R. Maurer, Fast Determination of Acrylamide in Food Samples Using Accelerated Solvent Extraction Followed by Ion Chromatography with UV or MS Detection, Application Note 409 (2003) 1-4.
- [94] J. Rosén, K.-E. Hellenäs, Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Analyst*. 127 (2002) 880–882.
- [95] Waters Corporation, Atlantis T3 and acquity UPLC HSS T3 column, Product Guide (2007); Disponível em: <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720001887en.pdf>, [consulta: 11-03-2014].
- [96] R.E. Ardrey, Liquid Chromatography– Mass Spectrometry: An Introduction, 1st ed., Wiley - Analytical Techniques in the Sciences, Chichester, (2003) 2-71.
- [97] D. Bell, C. Santasania, H. Brandes, H. Cramer, S. Wyatt, HPLC Troubleshooting - Desde a Perspectiva do Desenvolvimento de Métodos: como evitar os 12 problemas mais frequentes através do desenvolvimento inteligente de métodos, Sigma Aldrich. (n.d.); Disponível em: http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/20640/HPLC_Troubleshooting.pdf, [consulta: 21-02-2014].
- [98] J. Pereira, E. Barracho, Guia de validação de métodos cromatográficos, CESAB (2013) 1-10.
- [99] Engineering and Analysis Division - US Environmental Protection Agency, EPA Method 1694: Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS, (2007); Disponível em: http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/bioindicators/upload/2008_01_03_methods_method_1694.pdf, [consulta: 19-12-2013].
- [100] H. John, H. Thiermann, M. Eddleston, R.E. Clutton, F. Worek, Simultaneous quantification of the organophosphorus pesticides dimethoate and omethoate in porcine plasma and urine by LC–ESI-MS/MS and flow-injection-ESI-MS/MS, *J. Chromatogr. B*. 878 (2010) 1234–1245.
- [101] IPQ - Instituto Português da Qualidade, NP EN ISO/IEC 17025:2005 (2ª Edição), (2005).
- [102] E.J. Miller, Performance Parameters: Calculations and Tests, in: J. Ermer, J. Miller (Eds.), *Method Valid. Pharm. Anal. A Guid. to Best Pract.*, 2nd ed., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2005: pp. 21–194.
- [103] Joint Committee for Guides in Metrology, International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM) 3rd Edition, (2012) 21-27; Disponível em: http://www.bipm.org/utils/common/documents/jcgm/JCGM_200_2012.pdf, [consulta: 27-03-2014].

- [104] J.C. Miller, James N., Miller, Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, 5th ed., Prentice Hall - Pearson Education Limited, Harlow, (2005) 121-134.
- [105] W.G.- P. Bievre, EURACHEM: The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (1998); Disponível em: <http://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/valid.pdf>, [consulta: 11-04-2014].
- [106] A. Castro, L. Cabrita, Guia RELACRE 13 - Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química, RELACRE - Assoc. Laboratórios Acreditados Port. (2000) 6-29.
- [107] N.C. Hughes, E.Y.K. Wong, J. Fan, N. Bajaj, Determination of carryover and contamination for mass spectrometry-based chromatographic assays., AAPS J. 9 (2007) 353–360.
- [108] International Organization for Standardization, ISO 5725-1: Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 1: General principles and definitions, (1994) 1-13.
- [109] Analytical Methods Committee - The Royal Society of Chemistry, Terminology - the key to understanding analytical science. Part 1: Accuracy, precision and uncertainty, (2003).; Disponível em: <http://www.rsc.org/pdf/amc/brief13.pdf>, [consulta: 18-04-2014].
- [110] B. Magnusson, T. Näykki, H. Hovind, M. Krysell, NORDTEST - Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories, Edition 3.1, (2012) 3-18.
- [111] W. A. Williams, Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, 3rd Edition, EURACHEM/CITAC (2011) 4-20.
- [112] Instituto Português de Acreditação (IPAC), Guia para a Quantificação de Incerteza em Ensaio Químicos - OGC007, (2007) 1–19.
- [113] Avantor Performance Materials, Extraction of Acrylamide in Water, Waste Water and Sludge, (2012); Disponível em: <http://www.avantormaterials.com/WorkArea/showcontent.aspx?id=4294998442>, [consulta: 16-03-2014].
- [114] J. Pereira, S. Pinheiro, Determinação de Acrilamida: Método de extração em fase sólida e cromatografia líquida de ultra eficiência associada a espectrometria de massa (SPE-UPLC-MS/MS), CESAB (2014).
- [115] T. Singtoroj, J. Tarning, A. Annerberg, M. Ashton, Y. Bergqvist, N.J. White, et al., A new approach to evaluate regression models during validation of bioanalytical assays., J. Pharm. Biomed. Anal. 41 (2006) 219–27.

- [116] Sematech, NIST/SEMATECH e-Handbook of Statistical Methods, NIST/SEMATECH. (2013); Disponível em: <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/>, [consulta: 30-04-2014].
- [117] A. Delle Site, Factors Affecting Sorption of Organic Compounds in Natural Sorbent/Water Systems and Sorption Coefficients for Selected Pollutants: a review, Am. Inst. Phys. (2001) 194-216.
- [118] EPAL - Empresa Portuguesa das Águas Livres, Qualidade da Água para Consumo Humano - Relatório 2011-2012, Lisboa, 2012; Disponível em: <http://www.epal.pt/epal/DownloadsImgPdf.aspx?src=RelatQualidade&area=283&sub=5615&menu=5615>, [consulta: 23-04-2014].
- [119] Engineering Metrology Sectional Committee, ISO 5725-6 - Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 6: Use in practice of accuracy values, Int. Organ. Stand. (2003) 1-5.
- [120] A. Maroto, R. Boqué, J. Riu, F. Xavier Rius, Estimation of measurement uncertainty by using regression techniques and spiked samples, Anal. Chim. Acta. 446 (2001) 131-143.
- [121] L. Huber, Validation of Analytical Methods, Agilent Technologies (2010) 13-26.